



THESE / UNIVERSITE DE BREST
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BREST
Mention : Ecologie Microbienne
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Lucile DURAND

Préparée à l'UMR 6197, Ifremer-CNRS-UBO
Etablissement de rattachement : Ifremer, Centre de Brest
Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

Intitulé de la thèse :

« Etude de la diversité des
peuplements épibiontes
associés au tractus
digestif de la crevette
hydrothermale *Rimicaris
exoculata* : une possible
association mutualiste »

Thèse soutenue le 26 février 2010 devant le jury composé de :

Pr Daniel PRIEUR (*Président du jury*)

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes
UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, Université de Bretagne Occidentale, France

Pr Marc-André Sélosse (*Rapporteur*)

Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, équipe Interactions Biotiques
UMR 5175 CNRS, Université de Montpellier II, France

Dr Philippe Compère (*Rapporteur*)

Laboratoire de Morphologie Fonctionnelle et Evolutive, unité de
Morphologie Ultrastructurale
Université de Liège, Belgique

Pr Georges BARBIER (*Examineur*)

Laboratoire de Biodiversité et Ecologie Microbienne
Ecole Supérieure de Microbiologie et Sécurité Alimentaire de Brest, France

Dr Magali Zbinden (*Examineur*)

Laboratoire Systématique, Adaptations et Evolution, équipe Adaptation aux
Milieux Extrêmes

UMR 7138 CNRS, Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, France

Dr Marie-Anne CAMBON-BONAVITA (*Directeur de thèse*)

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes
UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, Ifremer Centre de Brest, France



JORGE CHAM © 2009



THE ORIGIN OF THE THESES

WWW.PHDCOMICS.COM

REMERCIEMENTS

***Lucile* sp., sp. nov., gen., nov., une nouvelle espèce dans le domaine de l'écologie microbienne.**

Introduction

L'aboutissement de ces premières années de recherche se traduit par la défense de mon travail de thèse. Ce projet est né d'un grand intérêt pour les sciences du Vivant, en particulier pour ce qui est de la compréhension du Vivant au travers de l'étude des diverses interactions permettant les adaptations évolutives et les adaptations à l'environnement. La réalisation de ce projet a été possible grâce à la mise en place de nombreux échanges de diverse nature dont j'aimerais remercier certains acteurs.

Matériels et méthodes

Soutien financier

Ce travail de recherche a été réalisé grâce au soutien financier de l'Ifremer et de la région Bretagne et à la participation du GDR ECCHIS et de l'ANR DEEPOASES.

Soutenance de thèse

J'exprime ma reconnaissance aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie particulièrement les rapporteurs, Marc-André Sélosse, Professeur à l'Université de Montpellier II et Philippe Compère, Chef de travaux à l'Université de Liège d'avoir consacré du temps pour l'étude attentive de mon manuscrit. Je remercie également Daniel Prieur, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, Georges Barbier, Professeur à L'Ecole Supérieure de Microbiologie et de Sécurité Alimentaire de Brest et à l'Université de Bretagne Occidentale et Magali Zbinden, Maître de conférences à L'Université Pierre et Marie Curie pour leur participation à ce jury de thèse.

Le travail en laboratoire

Mon travail de thèse a pu être réalisé dans de très bonnes conditions au Centre Ifremer de Brest, tout d'abord grâce à ma directrice de thèse, Marie-Anne Cambon-Bonavita,

mais aussi grâce à l'accueil de toute l'équipe du LM2E, dirigée par Joël Querellou, Daniel Prieur et Anne Godfroy (sans oublier l'efficacité et la bonne humeur de Christine Lamy, notre secrétaire). Merci également à notre chef de département Daniel Desbruyères pour ses conseils avisés.

Au cours de mon doctorat, j'ai eu la chance d'être habilement conseillée. Au sein de l'équipe du LM2E, mon attention va particulièrement vers Marie-Anne Cambon-Bonavita et Valérie Cueff-Gauchard. Merci à Erwan Roussel d'avoir donné de son temps pour partager ses compétences. Je tiens aussi à remercier Anne Godfroy pour sa présence tout au long de mon doctorat mais aussi Stéphane L'Haridon et Laurent Toffin pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour leur bonne humeur. J'ai eu l'occasion d'interagir avec d'autres personnes qui m'ont également beaucoup appris. Parmi elles, je pense à Philippe Crassous, Yves Fouquet, Magali Zbinden, Sébastien Duperron et Bruce Shillito. Enfin, je suis reconnaissante envers Michel Segonzac pour avoir partagé sa précieuse connaissance du modèle d'étude *Rimicaris exoculata*.

Merci aux personnes que j'ai eu l'occasion d'encadrer au cours de mon doctorat et qui m'ont aidé dans mon travail, avec une attention particulière à Mathieu Guri qui a été très efficace et à Cyrielle Jan.

Merci à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de ce travail, au laboratoire, au département, au programme et aux collaborations.

La collecte des échantillons

C'est une chance d'avoir participé à deux reprises à des campagnes océanographiques. Je remercie d'ailleurs les commandants Alix et Houmard ainsi que les équipes des navires *Pourquoi pas ?* et *L'Atalante*. Pour leur efficacité, leur amabilité et les divers échanges que j'ai pu avoir avec eux, je remercie particulièrement les équipes en charge des sous-marins dont Patrick Cheilan, Jean-Yves Tous et Gérard Vultaggio faisaient partie. Bravo pour leur dextérité lors de la collecte des spécimens de crevettes et des moules... Je remercie les chefs de missions qui ont rendu ce travail possible : Anne Godfroy, Yves Fouquet, Françoise Gaill et Jérôme Dymont.

La vie après le labo (et oui, il y en a une...)

Près de 500 heures d'équitation ont été nécessaires pour amener ce projet à bien. Pour cela, je dois beaucoup à Meli Melo et Ilaad. Je ne sais pas comment exprimer ma gratitude envers Meli Melo qui m'a, et qui m'apporte encore tellement (si ce n'est avec un gros sac de carottes !). Pour m'avoir suivie, aidée et encouragée dans l'aboutissement de mon travail de thèse, je remercie ma famille et mes amis, très chers à mon cœur. Papa,

Maman, merci de votre soutien, sous quelque forme qu'il soit (et qu'il ait été). Merci à mes grands-parents de croire en moi (avec une pensée particulière pour ceux qui ne sont plus là pour me le dire). Merci à ma petite sœur et à mon petit frère dont je suis très fière. Merci à Jeannot qui m'a donné beaucoup et qui a supporté beaucoup.

Résultats – Discussion

Je ne suis pas originaire de Brest, ni même de Bretagne, et les premiers temps ont été difficiles. Mais au fil des mois, j'ai appris à apprécier les gens plaisants, la mer, les paysages de tableaux, bref une vie très agréable. Une fois l'adaptation à l'environnement établie, des interactions se sont mises en place au sein mon écosystème. Cela m'a permis d'évoluer au cours de ces dernières années. En biologie, l'évolution est la modification des espèces vivantes au cours du temps suite à des événements clés. Ces événements peuvent être de plus ou moins grande importance. Pour l'évolution de l'espèce *Lucile* sp., certains événements ont nécessité un apprentissage pour être acquis par la suite. Par exemple, comment prendre l'avion, comment allumer la lumière dans une chambre d'hôtel ou quelle fourchette utiliser en premier (merci Anne)... D'autres ont nécessité une capacité d'adaptation à toute épreuve et l'intervention d'espèces modèles (enfin pas toujours... Merci Marie-Anne, Valérie et Magali). Un événement phare a été la rencontre du Guignol d'or d'Orléans qui a beaucoup participé à la spéciation de l'espèce *Lucile* sp.

Donc suite à de nombreux événements évolutifs dont les quelques exemples précédents représentent des points clés, l'évolution de l'espèce *Lucile* sp. s'est mise en place progressivement. La pérennité de l'espèce est assurée grâce à des échanges variés, de diverse nature. Les plus importants sont d'une part, les interactions mutualistes établies avec Marie-Anne (pour sa disponibilité et les échanges quotidiens, professionnels ou personnels). D'autre part, les interactions mutualistes établies avec ma famille, mes amis et Meli Melo. Parmi elles, certaines de ces interactions représentent l'essence même de la compréhension de l'espèce *Lucile* sp., comme par exemple la relation avec Meli Melo, qui est une symbiose à caractère obligatoire. D'autres participent de façon significative au développement de l'espèce. Entre autres, Stéphanie, ma sœur chérie : merci, tout simplement... La description de cette nouvelle espèce *Lucile* sp. passe aussi par la description des espèces satellites, représentant une des parties les plus importantes de la biocénose de son écosystème, aussi appelée « club des cinq ». *Marie* sp. et *Nathalie* sp. par exemple, représentent les espèces « béquille » ou « pilier » (que dire de plus !). Une interaction particulière avec une espèce rare affiliée au Pedrodactyle, participe à l'équilibre de l'espèce. Une petite nouvelle dans le « club des cinq » et qui commence à avoir une

sacrée répartie permet de venir à bout des grilles difficiles... Et enfin, une espèce unique incarnant la Quintessence de l'Univers, sans qui bien sûr *Lucile* sp. (et le monde...) ne serait rien. Cette sphère restreinte mais vitale constitue un caractère essentiel de mon écosystème.

Conclusion

La définition de l'espèce *Lucile* sp. repose donc sur un réseau complexe d'interactions durables diverses.

L'écriture des remerciements a été un exercice difficile. J'espère n'avoir offensé personne en rédigeant ces mots. Que ceux que j'aurais pu oublier veulent bien me pardonner. Que ceux que je n'ai pas oubliés sachent que ces mots sont honnêtes et sincères...

“Life did not take over the globe by combat, but by networking” Lynn Margulis

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	3
INTRODUCTION	7
1 - La symbiose	7
1.1 - Qu'est-ce qu'une symbiose ?	7
1.2 - Une symbiose ? Des symbioses ? Définitions !	8
<u>Les partenaires</u>	8
<u>Symbiose au sens large</u>	8
<u>Neutralisme</u>	9
<u>Antagonisme et compétition</u>	9
<u>Ammensalisme</u>	10
<u>Commensalisme</u>	10
<u>Mutualisme et symbiose stricto sensu</u>	11
<u>Parasitisme</u>	12
1.3 - Les symbioses ou comment transformer les inconvénients en avantages	13
<u>Avantages du mutualisme</u>	13
<u>Incidences des interactions durables</u>	14
<u>Les symbioses ou la colonisation réussie des environnements extrêmes</u>	17
1.4 - Pérennité des symbioses : de la descendance familiale à l'intégration évolutive	19
<u>Acquisition et transmission des symbiotes</u>	19
<u>Implications moléculaires des interactions durables</u>	21
<u>Interactions durables et évolution</u>	24

2 - Les écosystèmes hydrothermaux marins profonds	27
2.1 - Formation d'un écosystème hydrothermal	27
2.2 - Les sites hydrothermaux : localisation et considérations géochimiques	28
2.3 - Faune associée aux écosystèmes hydrothermaux	31
<u>Répartition faunistique</u>	31
<u>Rôle et occurrence des symbioses dans les écosystèmes hydrothermaux</u>	33
3 - Le tractus digestif des crustacés	36
3.1 - Anatomie du tractus digestif des crustacés	36
3.2 - Organisation fonctionnelle du tractus digestif des crustacés	37
<u>Ingestion et direction des particules alimentaires</u>	37
<u>Digestion et absorption des molécules alimentaires</u>	38
3.3 - Occurrence des symbioses du tractus digestif chez les crustacés marins	40
<u>Colonisation microbienne du tractus digestif des crustacés marins</u>	40
<u>Le tractus digestif des crustacés marins et les communautés microbiennes associées</u>	41
<u>Rôle du mutualisme digestif chez les crustacés marins</u>	43
3.4 - Méthodes d'étude des symbioses	44
<u>Techniques de culture</u>	45
<u>Techniques de microscopie</u>	45
<u>Techniques moléculaires et biochimiques</u>	50
<u>Approche in vivo</u>	53
4 - Rimicaris exoculata : sa vie, son œuvre	55

4.1 - <i>Rimicaris exoculata</i> : « vos papiers s'il vous plaît ! »	55
4.2 - <i>Rimicaris exoculata</i> : « its way of life »	57
<u>Comportement d'une crevette aveugle...</u>	57
<u>...ou comment évoluer sans canne blanche</u>	58
4.3 - <i>Rimicaris exoculata</i> : un hôte plutôt chaleureux...	60
<u>L'épibiose du céphalothorax</u>	60
<u>L'épibiose du tractus digestif</u>	64
<u>Un mode de nutrition hypothétique</u>	65

RESULTATS

CHAPITRE 0 : DE L'ETUDE SUR LE TERRAIN AU TRAVAIL EN LABORATOIRE	73
1 - La collecte des échantillons ou comment aller à la pêche aux crevettes ?	73
2 - Réflexions préliminaires à la mise en place du protocole expérimental	75
3 - Approche <i>in vivo</i> : méthodologie de l'étude « sur le terrain »	75
3.1 - Appareillage spécifique	75
3.2 - Expérimentations pour l'étude de la communauté épibionte autochtone	77
3.3 - Expérimentations pour l'étude de l'activité et du rôle de la communauté épibionte	77
<u>Le métabolisme du soufre</u>	77

<u>Le métabolisme du méthane</u>	78
<u>Le métabolisme du fer</u>	79
<u>Expérimentations in vivo</u>	79
4 - Approche culturelle : méthodologie de l'étude en laboratoire	80
4.1 - Méthodologie de l'approche culturelle	81
<u>L'inoculation des milieux de culture</u>	81
<u>Les milieux de culture utilisés</u>	81
<u>Les techniques de culture</u>	83
4.2 - Résultats et discussion sur l'approche culturelle	84
4.3 - Bilan	88
CHAPITRE I : DIVERSITE MICROBIENNE ASSOCIEE AU TRACTUS DIGESTIF DES CRUSTACES	93
1 - Exemple de <i>Rimicaris exoculata</i> (Crustacea : Decapoda) :	93
« Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp <i>Rimicaris exoculata</i> gut and occurrence of a resident microbial community » Durand et al., 2009	
1.1 - Introduction de l'étude	93
<u>Etat de l'art</u>	93
<u>Méthodologie utilisée</u>	93
<u>Résultats obtenus</u>	93
1.2 - Conclusions de cette étude	108
<u>Rappel des principaux résultats</u>	108

<u>Expériences complémentaires</u>	108
2 - Exemple de <i>Ventiella sulfuris</i> (Crustacea : Amphipoda) :	117
« New digestive symbiosis in the hydrothermal vent amphipoda <i>Ventiella sulfuris</i> » Corbari et al., soumis	
2.1 - Introduction de l'étude	117
<u>Contexte scientifique</u>	117
<u>Etat de l'art</u>	117
<u>Méthodologie utilisée et résultats obtenus</u>	117
2.2 - Conclusions de cette étude	156
<u>Rappel des principaux résultats</u>	156
<u>Expériences complémentaires</u>	156
CHAPITRE II : BIOGEOGRAPHIE DES EPIBIONTES ASSOCIES	163
AU TRACTUS DIGESTIF DE <i>RIMICARIS EXOCULATA</i>	
1 - « Biogeographical distribution of the <i>Rimicaris exoculata</i> gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge » Durand et al., <i>in prep</i>	163
1.1 - Introduction de l'étude	163
<u>Etat de l'art</u>	163
<u>Méthodologie utilisée et résultats obtenus</u>	163
1.2 - Conclusions de cette étude	197
<u>Rappel des principaux résultats</u>	197
<u>Expériences complémentaires</u>	197

CHAPITRE III : ACTIVITE DES EPIBIONTES ASSOCIES AU TRACTUS DIGESTIF DE *RIMICARIS EXOCULATA* EN FONCTION DU STADE DE MUE ET DU NIVEAU DE NUTRITION 203

1 - « Influence of moult stage and nutrition level on the epibiont gut microbial communities of *Rimicaris exoculata* » Durand et al., *in prep* 203

1.1 - Introduction de l'étude 203

Etat de l'art 203

Méthodologie utilisée et résultats obtenus 204

1.2 - Conclusions de cette étude 229

Rappel des principaux résultats 229

Expériences complémentaires 230

CHAPITRE IV : RECHERCHES D'INTERACTIONS ENTRE *RIMICARIS EXOCULATA* ET LES AUTRES MICRO-ORGANISMES : LES MICRO-ORGANISMES *EUCARYOTA* 235

1 - "Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: diversity and association with fauna" Burgaud et al., accepté 235

1.1 - Introduction de l'étude 235

Contexte scientifique 235

Etat de l'art 236

Méthodologie utilisée et résultats obtenus 236

1.2 - Conclusions de cette étude et implications pour l'écologie de *R.* 250

exoculata

<u>Rappel des principaux résultats</u>	250
<u>Expériences complémentaires</u>	250
BILAN-PERSPECTIVES	257
1 - Principaux résultats de mon travail pour l'étude de l'épibiose intestinale de <i>Rimicaris exoculata</i>	257
1.1 - Les faits marquants	257
1.2 - <i>Nouvelles hypothèses</i>	259
1.3 - Position de <i>R. exoculata</i> dans son contexte biogéochimique	259
2 - <i>Rimicaris exoculata</i> : un modèle qui a de l'avenir...	261
2.1 - Perspectives générales	261
2.2 - Etude des relations hôte-symbiontes	262
2.3 - Etude des relations hôte-symbiontes avec l'environnement	265
3 - Conclusion	265
BIBLIOGRAPHIE	271

Liste des figures

Fig.1	Schéma d'un écosystème	7
Fig.2	Schéma de la valence écologique d'un individu	8
Fig.3	Evolution de l'anatomie du trophosome de <i>Riftia pachyptila</i>	12
Fig.4	Exemple de scénario sur l'origine des eucaryotes	15
Fig.5	Exemples de mollusques photosynthétiques	16
Fig.6	Morphologie des lichens	17
Fig.7	<i>Convoluta roscoffensis</i>	20
Fig.8	Schéma du système de sécrétion de type III de <i>S. typhimurium</i>	22
Fig.9	Les relations symbiotiques et le système de sécrétion de type III	23
Fig.10	Fonctionnement d'une source hydrothermale marine profonde	27
Fig.11	Carte de la répartition des dorsales océaniques	28
Fig.12	Les sites hydrothermaux Rainbow et Lost City	30
Fig.13	Courbes de croissance de certains micro-organismes	31
Fig.14	Répartition d'espèces modèles endémiques des écosystèmes hydrothermaux	32
Fig.15	Répartition des symbiontes branchiaux de <i>B. azoricus</i> et <i>B. heckerae</i>	34
Fig.16	Hybridation <i>in situ</i> des symbiontes branchiaux de <i>B. azoricus</i>	35
Fig.17	Schéma de l'anatomie interne générale des crustacés	36
Fig.18	Schéma de l'anatomie du tractus digestif de <i>Rimicaris exoculata</i>	37
Fig.19	Schéma du tractus digestif antérieur des crustacés décapodes	39
Fig.20	Les crustacés marins et les micro-organismes du système digestif	42
Fig.21	La résolution des techniques de microscopie	46
Fig.22	Micro-autoradiographie de cellules d' <i>Achromatium</i>	47

Fig.23	Epibiontes de la cavité céphalothoracique de <i>R. exoculata</i>	48
Fig.24	Observation en fluorescence et NanoSIMS d'un consortium microbien	50
Fig.25	Taxinomie de l'espèce <i>Rimicaris exoculata</i>	55
Fig.26	Différents stades de développement de <i>R. exoculata</i>	57
Fig.27	Vue ventrale de <i>R. exoculata</i>	59
Fig.28	Vue interne de la cavité céphalothoracique de <i>R. exoculata</i>	59
Fig.29	Différents stades de mue de <i>R. exoculata</i>	60
Fig.30	Diversité des épibiontes de la cavité céphalothoracique de <i>R. exoculata</i>	61
Fig.31	La colonisation microbienne de la cavité céphalothoracique de <i>R. exoculata</i>	63
Fig.32	Soie bactériophage d'une scaphognathite	64
Fig.33	Les campagnes océanographiques : sites et matériels	74
Fig.34	Prélèvement et expérimentation <i>in vivo</i> des animaux marins profonds	76
Fig.35	Les voies métaboliques des micro-organismes méthanotrophes	78
Fig.36	La culture de micro-organismes ferro-oxydants en double gradient	84
Fig.37	Etude d'une souche méthylo-trophe	86
Fig.38	Observations microscopiques de micro-organismes ferro-oxydants	87
Fig.39	Les micro-organismes associés à l'estomac de <i>R. exoculata</i>	110
Fig.40	L'estomac de <i>M. fortunata</i> , <i>C. chacei</i> , et de <i>R. exoculata</i> juvénile et adulte	112
Fig.41	Les micro-organismes associés au tube digestif de <i>M. fortunata</i> et <i>C. chacei</i>	113
Fig.42	Le cycle de mue de <i>R. exoculata</i>	229

Liste des tableaux

Tab.1	Types d'interactions entre individus au sein d'un écosystème	9
Tab.2	Concentrations des minéraux et gaz des fluides de deux sites de la MAR	29
Tab.3	Genres microbiens retrouvés dans les tubes digestifs des crustacés marins	41
Tab.4	Activités microbiennes dans le tube digestif des crustacés marins	44
Tab.5	Composition du milieu de culture des micro-organismes ferro-oxydants	81
Tab.6	Composition du milieu de culture des micro-organismes méthanotrophes	82
Tab.7	Composition du milieu de culture des <i>Deferribacter</i>	83

*“We are symbionts on a symbiotic planet,
and if we care to, we can find symbiosis everywhere.”*

Lynn Margulis

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont des écosystèmes privés de lumière, où les micro-organismes chimiolithoautotrophes sont les principaux producteurs primaires. Dans ces milieux extrêmes, les exemples d'épibioses microbiennes sont nombreux et sont décrits aussi bien sur des invertébrés du pôle chaud que du pôle froid. Les modèles animaux du pôle chaud les plus étudiés sont les polychètes comme *Alvinella pompejana* par exemple, et les principaux modèles du pôle froid sont les bivalves tels que *Bathymodiolus azoricus* et *Calyptogena magnifica* ou les vestimentifères dont *Riftia pachyptila* est le plus étudié.

Le sujet présenté dans ce mémoire privilégie une espèce majeure et encore peu étudiée des sites hydrothermaux marins profonds de l'Atlantique, la crevette caridée *Rimicaris exoculata* (Williams et Rona, 1986). Ce crustacé aveugle domine la macrofaune de nombreux sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique (MAR). Il forme des agrégats très mobiles et denses au contact des parois des cheminées actives (Segonzac, 1992) qu'il semble gratter en permanence. Son comportement atypique autour des édifices actifs a posé et pose encore de nombreuses questions quant à son mode de vie et de nutrition. La cavité céphalothoracique de *R. exoculata* est hypertrophiée et abrite des populations denses et organisées de bactéries épibiontes (Van Dover et al., 1988 ; Segonzac, 1992 ; Segonzac et al., 1993 ; Gebruk et al., 2000 ; Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a, 2008b), présentant une faible diversité apparente et supposées sulfo-oxydantes (Polz et Cavanaugh, 1995 ; Polz et al., 1998). Les auteurs proposaient alors plusieurs hypothèses concernant l'écologie de la crevette. (1) La nutrition est principalement basée sur la consommation des micro-organismes présents sur les cheminées hydrothermales (Van Dover et al., 1988). (2) Elle pourrait se nourrir des épibiontes de la cavité céphalothoracique ingérés suite au grattage du tapis microbien (Van Dover et al., 1988 ; Segonzac et al., 1993 ; Casanova et al., 1993 ; Polz et Cavanaugh, 1995 ; Gebruk et al., 2000) ou naturellement présents dans le flux d'eau irriguant la cavité ou encore via des transferts trans-épidermiques (Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a, 2008b) . (3) Elle possède une communauté microbienne dans le tractus digestif (Polz et al., 1998), cette dernière hypothèse n'excluant pas les deux premières. Ainsi, toutes les hypothèses sur le rôle des micro-organismes associés à *R. exoculata* restent ouvertes.

Une étude menée à la suite de la campagne ATOS (2001) sur le site Rainbow s'est focalisée sur deux compartiments chez *R. exoculata* : le céphalothorax, où une épibiose avait déjà été décrite, et le tractus digestif, où une épibiose était supposée. L'étude menée sur la cavité céphalothoracique a permis de décrire l'organisation du tapis microbien dans la cavité pré-branchiale supérieure, associé

à des oxydes de Fer. Les observations microscopiques ont montré que ce tapis n'était pas altéré mécaniquement (Zbinden et al., 2004 ; Corbari et al., 2008a, 2008b). Ceci contredisait donc partiellement l'hypothèse d'une nutrition par grattage des épibiontes. Par la suite, une étude de la biodiversité de ce tapis a été menée (Zbinden et al., 2008) et indiquait une diversité plus importante que celle décrite précédemment (Polz et Cavanaugh, 1995) et au moins trois métabolismes possibles (oxydation des sulfures, du méthane et du fer). En parallèle, l'étude menée sur le tractus digestif de *R. exoculata* a mis en évidence des micro-organismes non décrits dans l'environnement hydrothermal. Ainsi, la présence de micro-organismes dans le tube digestif de la crevette était confirmée et cette communauté microbienne était composée de bactéries épibiontes de la cavité branchiale, d'autres *Epsilonproteobacteria*, d'*Entomoplasmatales* et de *Deferribacterales* (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003). Ces résultats laissaient supposer l'existence d'une communauté microbienne interne spécifique. C'est dans ce contexte scientifique que mon travail de thèse a été initié.

La plupart des études menées jusqu'alors sur le modèle *R. exoculata* étaient descriptives et le rôle des communautés microbiennes associées (cavité céphalothoracique et système digestif) ainsi que leur acquisition primaire et entre chaque mue n'étaient toujours pas connus. Plusieurs hypothèses concernant le rôle des deux épibioses étaient avancées :

- Le rôle trophique : comment se font les échanges ? quels sont les métabolismes en jeu ? Y a-t-il une communauté microbienne interne digestive spécifique ?
- Le rôle de détoxification du milieu : les micro-organismes piègeraient les métaux lourds et/ou les composés toxiques tels que les sulfures, mais par quels mécanismes ?
- Le rôle de barrière biologique : les communautés microbiennes installées limiteraient la colonisation d'agents pathogènes (activité de peptides antimicrobiens ?).

Par une approche pluridisciplinaire (microbiologie, biologie et géochimie) et polyphasique (approches culturelle, moléculaire et microscopique), j'ai entrepris l'étude des communautés microbiennes associées au tractus digestif de *R. exoculata* afin de les décrire, d'étudier leur stabilité et de tenter de comprendre leur fonctionnement et leur(s) rôle(s) pour l'hôte. Pour cela, au cours de la campagne EXOMAR 2005, de nombreux échantillons avaient été collectés sur les sites Rainbow et TAG (crevettes, eaux, roches) et des expériences *in vivo* en aquarium pressurisé avaient été réalisées. La campagne Serpentine 2007 m'a permis d'accéder à des échantillons de deux autres sites de la MAR : Logatchev et le site nouvellement décrit Ashadzé (le plus profond connu sur lequel est retrouvée *R. exoculata*). Enfin, j'ai participé à la campagne MoMARDREAM-Naut 2007 afin de compléter les expérimentations en aquarium pressurisé puis à la campagne MoMAR08 2008 afin

d'échantillonner différents stades de croissance (juvéniles) et de mue ainsi que des spécimens d'autres crevettes hydrothermales. Trois objectifs majeurs étaient recherchés :

- 1) Décrire les communautés microbiennes du tractus digestif chez *R. exoculata* par approche moléculaire et par approches microscopiques : visualisation par des techniques classiques (microscopie photonique et électronique) et identification par hybridations *in situ*.
- 2) Etudier l'impact du contexte géochimique et géographique sur les communautés microbiennes du tractus digestif. Les échantillons nous permettront de comparer les communautés microbiennes épibiontes du tractus digestif de crevettes provenant de quatre sites (Rainbow, TAG, Logatchev et Ashadzé) qui présentent des conditions géochimiques et physiques contrastées :
 - le site Rainbow à 2300 m de profondeur, est particulièrement pauvre en sulfures et très enrichi en Fer II, et en certains gaz comme H₂, CH₄ et CO₂. C'est un système sur substrat mantellique.
 - le site TAG est un site plus profond (3600 m), riche en sulfures et appauvri en méthane. C'est un système sur substrat basaltique.
 - le site Logatchev est un site à 3000 m de profondeur présentant des conditions géochimiques intermédiaires aux deux précédents.
 - le site Ashadzé est à 4000 m de profondeur et ne présente pas d'agrégat dense de crevettes. C'est un système sur substrat mantellique.
- 3) Etudier la stabilité des communautés microbiennes du tractus digestif et les métabolismes en jeu. Les relations avec l'hôte (stabilité du microbiote digestif, métabolismes) à des stades de développement différents (adultes, différents stades de mue, juvéniles) seront abordées. Au cours des campagnes EXOMAR 2005 et MoMARDREAM-Naut 2007, des expériences dans les aquariums pressurisés ont été réalisées à bord des navires océanographiques:
 - Des jeûnes de différentes durées (pouvant aller jusqu'à 72 heures) ont été réalisés. Le terme de jeûne est utilisé ici faute d'un terme plus approprié, indiquant une privation de substrat rocheux ou du fluide hydrothermal. Dans un premier temps ceci permettra de voir si les communautés microbiennes du tube digestif sont spécifiques (elles seront toujours présente après le jeûne) ou si elles accompagnent les particules ingérées (elles seront évacuées avec les fèces).
 - Des enrichissements du milieu d'incubation en Fer II, en sulfures, en méthane et en hydrogène ont été réalisées afin d'étudier l'impact des concentrations en donneurs d'électrons sur la diversité microbienne (approche ADN et ARN). Des expérimentations ont été faites en présence de carbone marqué (¹³C et ¹⁴C) pour appréhender l'activité microbienne et les éventuels transferts à l'hôte. Des incubations en présence de BrdU, un

analogue de base de l'ADN permettant d'évaluer les divisions cellulaires, ont également été réalisées.

J'introduirai donc mon travail en présentant ce que sont les symbioses et les écosystèmes hydrothermaux. Puis je présenterai l'anatomie générale du tractus digestif des crustacés avant de présenter le modèle *Rimicaris exoculata* en détails. Suite à cela, les résultats seront présentés en cinq chapitres :

- Chapitre 0 : de l'étude de terrain au travail en laboratoire.
- Chapitre I : diversité microbienne associée au tractus digestif de crustacé hydrothermaux, exemples de la crevette *R. exoculata* et de l'amphipode *V. sulfuris*.
- Chapitre II : biogéographie des épibiontes associés au tractus digestif de *R. exoculata*.
- Chapitre III : activité des épibiontes associés au tractus digestif de *R. exoculata* en fonction du stade de mue et du niveau de nutrition.
- Chapitre IV : recherche d'interactions entre *R. exoculata* et les autres micro-organismes, les micro-organismes *Eucaryota*.

Le bilan des résultats et les perspectives qui feront suite à cette étude clôtureront la présentation de mon travail sur le modèle *R. exoculata*.

INTRODUCTION

1 - La symbiose

1.1 - Qu'est-ce qu'une symbiose ?

La vie est souvent définie comme étant un état homéostatique de la matière. Selon Claude Bernard, *l'homéostasie est l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie*. En effet, l'homéostasie est la capacité que peut avoir un système quelconque à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures. Ceci est possible grâce à l'acclimatation de l'organisme qui est une adaptation individuelle réversible, grâce à l'accommodation qui est une adaptation phénotypique individuelle ou grâce à l'apparition d'écotypes. Ces derniers sont liés à la pression de sélection exercée par les facteurs écologiques sur les populations soumises à leur influence, et qui sélectionne ainsi des caractères qui deviendront héréditaires. Ces phénomènes peuvent être observés au sein d'un écosystème : réseau d'interdépendances et d'interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques qui le constituent (**Fig.1**).

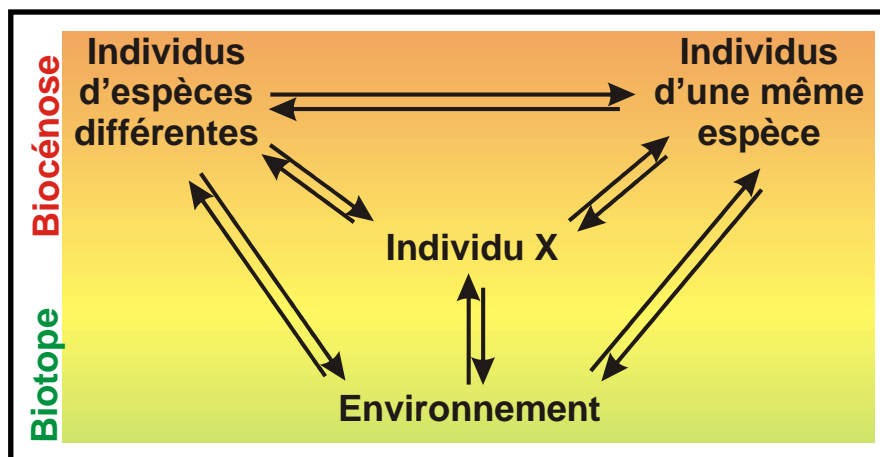


Fig.1 – Représentation schématique d'un écosystème.

Le terme écosystème a été créé en 1935 par Sir Arthur George Tansley et désigne l'ensemble formé d'une biocénose, communauté d'êtres vivants, et de son biotope, l'environnement. L'influence (présence et importance) des paramètres physico-chimiques sur la biocénose détermine la distribution et l'abondance des individus. Ceux-ci peuvent aussi avoir une influence sur le biotope. Les relations intraspécifiques, interactions entre individus d'une même espèce, et interspécifiques, interactions entre individus d'espèces différentes, contribuent à l'équilibre de l'écosystème. Il arrive que les relations interspécifiques modifient la valence écologique (**Fig.2**) d'un individu grâce au

développement d'un partenariat avec un ou plusieurs autres organismes, appelé symbiose (Sélosse 2000).

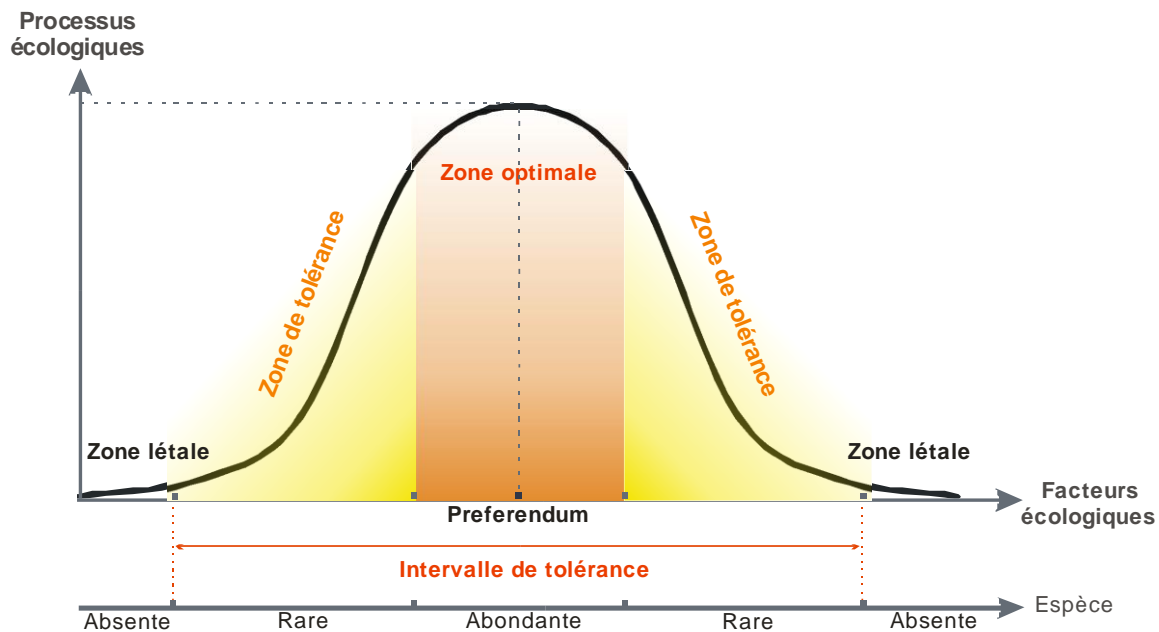


Fig.2 – Représentation schématique de la valence écologique d'un individu.

1.2 - Une symbiose ? Des symbioses ? Définitions !

Les partenaires - Il existe différentes relations symbiotiques. Elles peuvent avoir lieu entre deux individus appartenant à un même domaine du Vivant comme les lichens qui résultent d'une association entre une algue et un champignon (deux eucaryotes). Elles peuvent impliquer deux individus appartenant à des domaines différents tels qu'eucaryotes et procaryotes comme dans le cas de *Vibrio fischeri*, responsable de la bioluminescence dans l'organe lumineux de la seiche *Euprymna scolopes* (Kimbell et McFall-Ngai, 2003). Ces interactions peuvent aussi être de nature multiple comme dans l'exemple du rumen des ruminants arborant une importante population de champignons, d'eucaryotes unicellulaires, de bactéries, d'archaeas et de virus permettant la dégradation des composés organiques réfractaires. Ces interactions sont basées sur les échanges entre un hôte et un symbionte, l'hôte étant souvent par défaut le plus gros partenaire (et souvent le plus dépendant de cette relation).

Symbiose au sens large - Une fois le couple de partenaires identifié, la nature de l'interaction durable peut être définie. Très simplement, la symbiose au sens large est l'existence d'une relation entre les partenaires, qu'elle soit obligatoire ou pas, à bénéfice réciproque ou non. Cependant de façon plus fine, il existe différents types d'interactions entre les partenaires, et donc plusieurs symbioses au sens large (Sélosse, 2000). Elles seront toujours définies en fonction d'un référentiel

particulier qui caractérise l'ensemble des bénéfices retirés par l'hôte à travers cette relation. Elles peuvent être classées dans différentes catégories (**Tab.1**) selon l'influence qu'un partenaire a sur l'autre.

Tab.1 – Types d'interactions entre individus au sein d'un écosystème (d'après Sélosse 2000, eds Vuibert).

Type de relation	Partenaire A	Partenaire B
Neutralisme (pas d'action réciproque)	0	0
Antagonisme et Compétition (concurrence pour élimination de l'autre)	-	-
Ammensalisme (A inhibé par B)	-	0
Commensalisme (aide de A pour B sans aide de B pour A)	+	0
Mutualisme/Symbiose au sens strict (coopération)	+	+
Parasitisme et Prédation (obligatoire pour A, négatif pour B)	+	-

Neutralisme - Cette relation implique deux espèces sympatriques, c'est-à-dire qui occupent la même niche écologique, mais qui n'exercent aucune influence l'une sur l'autre. Par exemple, le cormoran huppé pêche dans les premières couches d'eau (lançons, anchois, harengs, sardines) tandis que le cormoran noir pêche dans les eaux plus profondes (poissons plats, crevettes, gobies, divers poissons benthiques). Ainsi, il n'existe pas de compétition entre ces deux espèces.

Antagonisme et compétition - Des espèces ou individus antagonistes sont en concurrence forte qui mène fréquemment à l'élimination d'au moins un des protagonistes. La compétition est une variante plus modérée de l'antagonisme : elle n'entraîne pas systématiquement l'élimination d'un protagoniste. Un des meilleurs exemples de compétition est l'introduction de nouvelles espèces dans un écosystème. Si ce nouvel écosystème convient à l'espèce introduite, elle peut entrer en compétition avec les populations autochtones sur un plan trophique ou pour l'habitat. Dans la rade de Brest par exemple, le mollusque gastéropode *Crepidula fornicata* fait des ravages. Il fut introduit en Angleterre à la fin du 19^e siècle suite à la transplantation d'huîtres de Virginie. Par la suite, la crépidule a envahi le littoral anglais. Elle est apparue en France sur les côtes normandes et dans la rade de Brest suite au débarquement des Alliés durant la Seconde Guerre Mondiale. Elle entre alors en compétition pour la nourriture et l'espace avec d'autres mollusques comme les moules et les huîtres et les élimine progressivement de leur environnement initial. Cette espèce est extrêmement compétitive de par sa stratégie de reproduction efficace : hermaphrodisme successif, fécondation directe, ponte multiple et protection des œufs. Le taux de croissance de sa population est très rapide, ce qui a pour conséquence une appropriation des ressources nutritives et de l'espace. Et cela

est conjugué à des effets indésirables aggravants comme la production importante de mucus qui étouffe la vie (algues, vers tubicoles, bivalves enfouis...) au niveau des sédiments marins.

Ammensalisme - Une espèce ammensale est inhibée dans sa présence, sa croissance ou sa reproduction par des substances excrétées ou sécrétées par une espèce dite inhibitrice, et qui modifient le milieu. Sur ce principe, le sapin *Abies balsamea* est une espèce inhibitrice pour la punaise *Pyrrhochoris apterus*. En effet, ce végétal produit une substance qui empêche la larve de l'insecte ammensal de se transformer en adulte. Ce genre de phénomène est courant dans la nature et trouve de nombreuses applications dans la lutte biologique en agriculture ou dans le domaine médical pour l'étude des molécules bioactives.

Commensalisme - C'est une association entre deux individus dont l'un des membres tire profit de l'autre sans pour autant lui porter préjudice. La relation est à bénéfice non-réciproque et c'est une association non-destructrice pour l'hôte. Les rapports entre les organismes commensaux peuvent être trophiques (métaboliques) ou phorétiques (de transport). Dans le cas du commensalisme trophique, si l'hôte fournit une partie de sa propre nourriture au commensal, il n'obtient en revanche aucune contrepartie évidente de ce dernier. Les pigeons (*Columba livia*) ou les moineaux (*Passer domesticus*) domestiques sont de bons modèles d'organismes commensaux de l'Homme pour illustrer cet exemple. Ils se nourrissent des restes de nourriture de l'homme (l'hôte), sans que celui-ci en soit affecté. Dans le cadre d'une relation de transport entre les individus associés, il s'agit de phorésie, d'endoécisme ou d'inquilinisme. Les relations entre l'hôte et l'associé peuvent être plus ou moins ambiguës. En cas de phorésie, le transport de l'associé par l'hôte reste sans nul doute du commensalisme, comme c'est le cas du poisson-pilote *Remora* sp. et du requin. Le poisson se détache et finit les restes du repas du squal, sans que cette relation nuise à son hôte. Dans cet exemple, le poisson présente une particularité optimisant son association avec le requin. Il possède une ventouse sur le haut du crâne lui permettant de se fixer à son hôte. L'association est plus ambiguë pour l'endoécisme dans lequel l'associé se trouve dans l'habitable de l'hôte sans lui causer, en apparence, ni avantage ni inconvénient. Par exemple, l'annélide polychète *Nereis furcata* vit dans la coquille du gastéropode *Buccinum undatum*, habitée par *Eupagurus bernhardus*. L'annélide sort de l'habitable pour prendre sa nourriture entre les mandibules du crustacé au moment de son repas, sans que ce dernier puisse l'ingérer. Cette association devient vraiment discutable dans le cas de l'inquilinisme, pour lequel l'associé vit dans une cavité interne de l'hôte, sans pénétrer dans les tissus et sans porter préjudice à l'hôte en apparence. *Pinnotheres pisum*, ou crabe petit-pois, vit dans la cavité branchiale de la moule commune *Mytilus edulis* (Orton, 1920). Il profite alors de la nourriture de l'hôte, mais entre aussi en compétition avec la moule pour la capture des copépodes (la moule se

nourrit d'algues et de copépodes tandis que le crabe sélectionne les copépodes). De plus, il se déplace dans la cavité branchiale ce qui désassocie les branchies et empêche l'hôte de respirer. Le commensalisme est finalement parfois une variante du parasitisme.

Mutualisme et symbiose stricto sensu - Cette association est à bénéfice réciproque pour les deux partenaires. Elle peut être facultative ou obligatoire. Bien souvent, dans le second cas, les survies des deux organismes sont interdépendantes et cette relation est nommée symbiose au sens strict. Il existe des exemples de mutualisme illustrant les différents degrés d'intimité de la relation entre les deux partenaires. Certains crustacés partagent avec des anémones une relation facultative d'entraide concernant la nourriture. Le crabe boxeur *Melia tessellata* porte l'anémone *Bunodeopsis prehensa* sur ses pinces (Guinot et al., 1995), ce qui a un rôle défensif ou agressif. Lorsqu'il repère une proie, il projette violemment ses pattes vers l'avant ce qui va faire fonctionner les cnidocystes de l'anémone. La proie (ou l'agresseur) est alors paralysée. En contre partie, cela augmente le territoire de chasse des anémones. Lors de la mue, le crustacé détache ses anémones pour les déposer sur un rocher. Puis il les récupère une fois sa carapace durcie. Les deux organismes peuvent vivre l'un sans l'autre mais cette association est à bénéfice réciproque.

Dans le cas d'une association plus étroite, dont il arrive souvent qu'un protagoniste soit à l'intérieur de l'hôte (ampoule du tube digestif, organe spécialisé de type bactériocyte, intracellulaire...), le terme le plus utilisé est symbiose, voire endosymbiose. Ce mutualisme est obligatoire et un partenaire ne peut pas vivre sans l'autre une fois la symbiose établie. Ceci semble évident chez *Riftia pachyptila* adulte par exemple, un vestimentifère hydrothermal (annélide). Les larves sont dotées d'un système digestif transitoire fonctionnel, avec une bouche et un anus (Nussbaumer et al., 2006). Chez les juvéniles, l'appareil digestif va progressivement s'atrophier et le tronc de l'animal va s'allonger (**Fig.3**). Ceci coïncide avec la reconnaissance du tégument de l'hôte par des symbiontes spécifiques sous forme libre dans l'environnement, des bactéries sulfo-oxydantes, et leur pénétration dans les tissus. Les adultes sont alors dépourvus de système digestif et leur trophosome (80% de la masse de l'animal) est alors un organe nettement différencié (**Fig.3**). C'est l'organe spécifique contenant les symbiontes dans des bactériocytes.

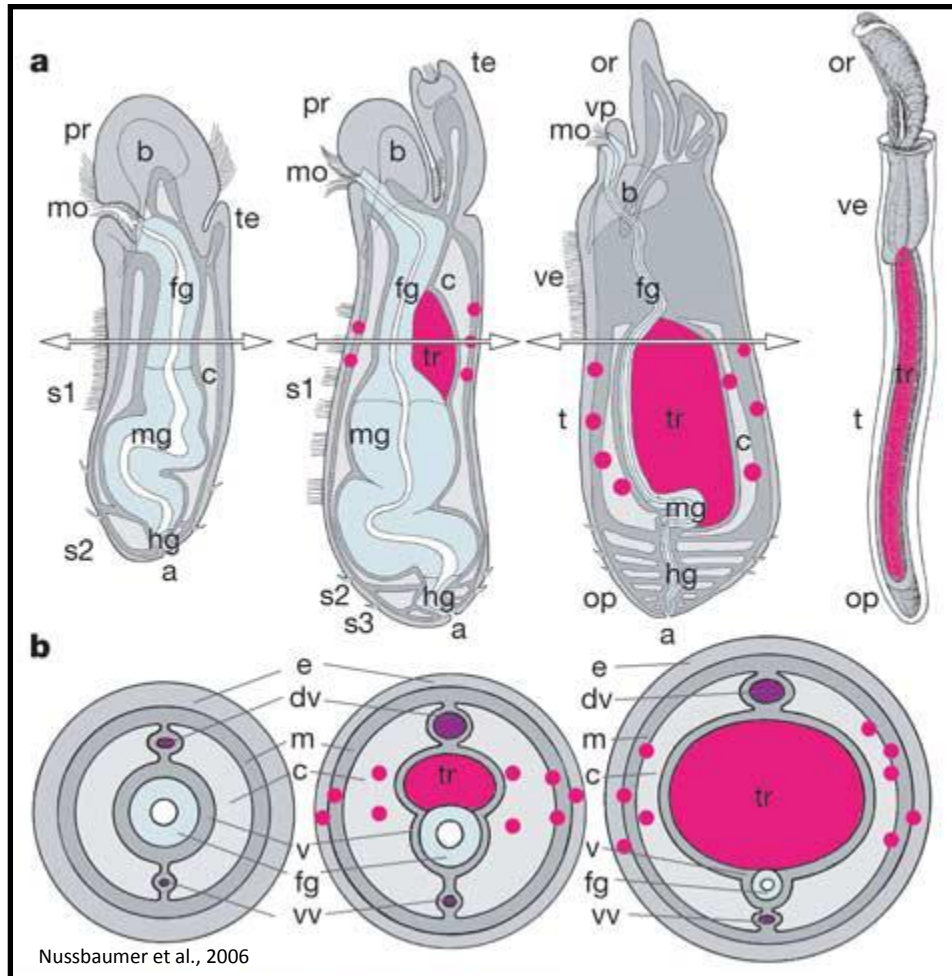


Fig.3 – Schémas représentant l'évolution de l'anatomie du trophosome de *Riftia pachyptila* en fonction du stade de développement de l'animal, réalisés à partir de coupes sériées. **a**, coupes sagittales ; **b**, coupes transversales. De gauche à droite : larve aposymbiotique avec un tractus digestif (fg + mg + hg pour « foregut + midgut + hindgut ») ouvert aux extrémités par une bouche (mo) et un anus (a) ; larve infectée par les symbiontes (en rose) avec début de développement du trophosome (tr) ; juvénile montrant un début d'élongation du tronc (t) et une différenciation du panache branchial (or) ; adulte présentant les tronc, trophosome et panache branchial différenciés ainsi qu'un tractus digestif résiduel. b = cerveau, c = coelome, dv = vaisseau sanguin dorsal, e = épiderme, m = muscles, op = opisthosome, or = obturaculum, pr = prostomium, te = tentacules, v = mésoderme viscéral, ve = vestimentum, vp = péristomium transformé en processus ventral, vv = vaisseau sanguin ventral.

Parasitisme – Un parasite se développe au dépend d'un hôte auquel il est fréquemment fixé et auquel il cause suffisamment peu de dommages pour n'entraîner la mort de celui-ci qu'à long terme, voire pas du tout. Cette relation est donc à sens unique : elle est bénéfique pour le parasite uniquement et elle peut être qualifiée de destructrice pour l'hôte. Elle pourrait être interprétée comme du mutualisme dont l'un des deux protagonistes aurait pris le pas sur l'autre. Certains embranchements sont composés presque exclusivement de parasites comme les plathelminthes monogènes (Whittington, 1998). Il existe des parasites obligatoires et des parasites facultatifs. Les

virus peuvent être considérés comme des parasites obligatoires : ils sont incapables de se répliquer sans l'intervention d'un hôte. Dans le cas du parasitisme facultatif, le parasite est capable de vivre et de se reproduire libre dans l'environnement ou avec l'intervention d'un hôte. Par exemple, le rotifère *Orchitophrya stellarum* est un parasite des spermatozoïdes d'étoiles de mer. Il a été montré que le protiste pouvait vivre indéfiniment en milieu marin mais que ses conditions optimales de croissance restent le mode de vie parasitaire (Stickle et al., 2007).

Le parasitoïsme est une variante extrême du parasitisme. Le parasitoïde entraîne la mort systématique de l'hôte et doit alors ensuite coloniser de nouveaux hôtes. Ceci est le cas de la guêpe *Aphidius ervi* qui pond un œuf dans le corps du puceron *Acyrtosiphon pisum* dont la larve qui en sera issue entraînera la mort de celui-ci (Brownlie et Johnson, 2009).

1.3 - Les symbioses ou comment transformer les inconvénients en avantages

[Avantages du mutualisme](#) - Comme précédemment expliqué, le mutualisme est une association à bénéfice réciproque. Cependant, les bénéfices ne sont pas les mêmes selon le partenaire envisagé.

Pour les symbiotes, en général le plus petit des protagonistes, l'association lui offre une protection face aux prédateurs ou à l'hostilité de l'environnement. Elle peut aussi permettre d'étendre le territoire de chasse du symbiote et surtout lui faciliter l'accès aux ressources nutritives. Dans le cas d'une symbiose interne, l'hôte apparaît comme un environnement stable, avec peu ou pas de variations des conditions physico-chimiques.

Concernant les hôtes, les produits de l'activité des symbiotes constituent souvent un apport énergétique non négligeable (dans certains cas, le seul). Certaines associations peuvent avoir un but détoxifiant comme chez l'isopode marin xylophage *Limnoria tripunctata* (Zacchary et Colwell 1979 et Zacchary et al., 1983). Lorsqu'il vit sur du bois non traité, il est dépourvu de microbiote intestinal. Mais lorsqu'il ingère du bois traité à la créosote, une communauté microbienne se met en place dans son appareil digestif. Ces micro-organismes auraient un rôle détoxifiant pour l'hôte. Il arrive que l'hôte profite du bénéfice des symbiotes à tel point que la relation bascule vers l'esclavagisme. C'est une hypothèse émise pour expliquer la relation entre les bivalves *Lucinidea* et leurs endosymbiotes branchiaux (Brissac et al., 2009) : dans cette association mutualiste où les endosymbiotes sont acquis par les juvéniles via l'environnement, il n'y aurait pas de multiplication des symbiotes dans les tissus de l'hôte. Ainsi, ils seraient intracellulaires et exploités jusqu'à leur mort, l'hôte renouvelant leur population au fil du temps grâce à de nouvelles acquisitions.

Le fait d'être en association avec une communauté de micro-organismes symbiotiques peut constituer un atout pour la lutte contre les pathogènes et les opportunistes. En effet, les deux types de communautés vont entrer en compétition. Dans le cas des bactéries symbiotiques, leur prolifération est souvent contrôlée par l'hôte mais aussi par la communauté de symbiotes elle-même, notamment via la sécrétion de bactériocines ou autres toxines. Ces molécules actives peuvent agir directement sur les micro-organismes opportunistes et pathogènes comme chez les embryons du homard *Homarus americanus* ou de la crevette *Palaemon macrodactylus*. Le champignon oomycète *Lagenidium callinectes* est un pathogène de nombreux crustacés. La cuticule externe des embryons de ce homard et de cette crevette présente une colonisation microbienne dense. Des travaux ont montré que des embryons dépourvus de micro-organismes étaient moins résistants à l'infection par le champignon que les embryons épibiotiques (Gil-Turnes et al., 1989 ; Gil-Turnes et Fenical, 1992). Il s'avère que certaines des souches bactériennes épibiotiques produisent des composés anti-fongiques (isatine et tyrosol). Les embryons de ces crustacés sont donc protégés par une communauté microbienne épibiotique mutualiste. Il existe également de nombreux exemples de protection de l'hôte grâce aux symbiotes chez les insectes entraînant une meilleure résistance aux conditions environnementales. Le puceron *Acyrtosiphon pisum* présente, comme de nombreux insectes, une symbiose multiple : un endosymbiote mutualiste obligatoire (*Buchnera aphidicola*) et trois endosymbiotes facultatifs (*Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica* et *Regiella insecticola*). *Aphidius ervi* est une guêpe parasitoïde du puceron. Elle pond un œuf à l'intérieur du corps du puceron. A son éclosion, la larve se nourrit de l'intérieur du puceron puis y forme un cocon tuant l'hôte avant de donner naissance à la guêpe adulte. Il a été constaté que la sensibilité des pucerons à l'infection par ce parasitoïde est liée à l'absence ou la présence des endosymbiotes facultatifs (Brownlie et Johnson, 2009). Il s'avère que *H. defensa* et *S. symbiotica* développeraient la résistance de l'hôte à l'infection en augmentant le taux de mortalité des larves de guêpe durant leur développement (Olivier et al., 2003). Quant à l'infection par le champignon *Pandora (Erynia) neoaphidis*, les hôtes associés à *R. insecticola* seraient cinq fois plus résistants à cette infection que ceux dépourvus de ces endosymbiotes (Golubovsky et Plus, 1982). Ce type d'interaction est à bénéfice réciproque : cela augmente la survie de l'hôte donc la possibilité de transmission des symbiotes et par voie de conséquence, la survie des symbiotes.

[Incidences des interactions durables](#) - Les symbioses ont un rôle clé dans les processus évolutifs au cours de l'établissement de la Vie sur Terre. Elles permettent la colonisation de nouveaux écosystèmes. La symbiose peut être si avantageuse que dans certains cas tel que la cellule eucaryote et la mitochondrie, il y a comme un début de fusion entre les partenaires. La symbiose pourrait alors être définie par l'équation suivante :

$$\text{Symbiose} \begin{cases} 1 + 1 = 1 \\ 1 + 1 = 3 \end{cases}$$

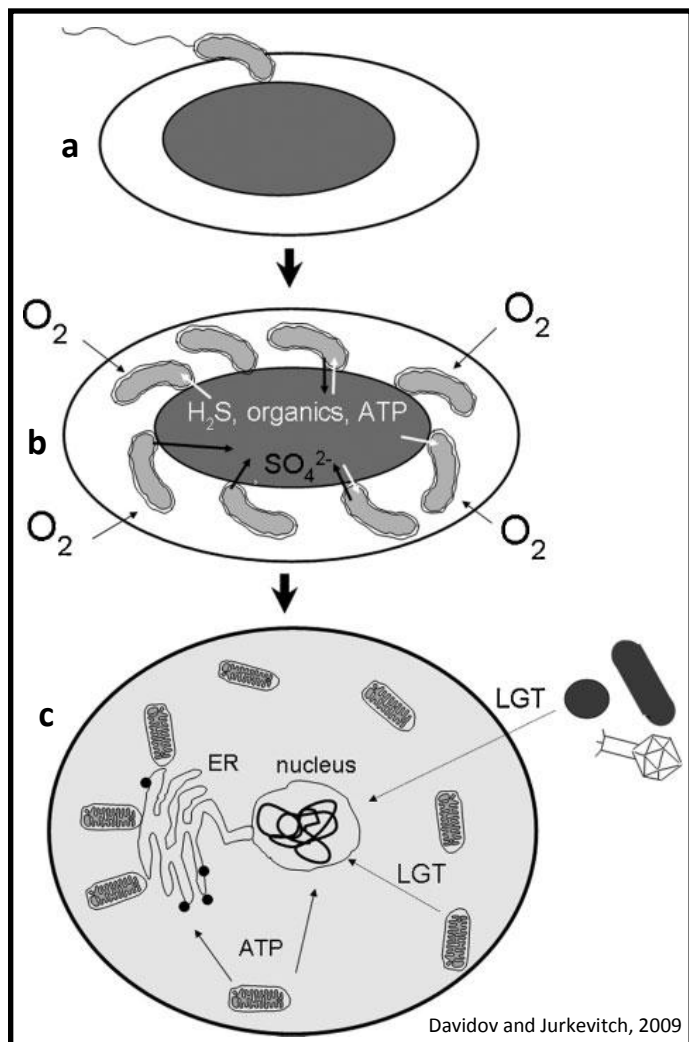
C'est-à-dire que l'ensemble des deux partenaires est indissociable, formant une entité fonctionnelle. Et l'association des deux partenaires est plus efficace, présentant de plus amples possibilités fonctionnelles dans un écosystème donné (correspondant à l'habitat de l'entité symbiotique : le symbiote et son hôte) que les deux partenaires l'un sans l'autre dans ce même écosystème. A l'heure actuelle, plusieurs stades évolutifs de la symbiose sont observables dans le monde vivant. La plus ancienne et la plus intime des relations hôte-symbiote constitue l'essentiel de la cellule eucaryote : ce sont les mitochondries et les plastes. Les analyses moléculaires des génomes de ces deux organites ont mené à l'hypothèse de l'endosymbiose primaire qui résulte de l'internalisation d'un procaryote dans une cellule eucaryote, dans laquelle il est délimité par deux membranes : la membrane de phagocytose et la sienne. La mitochondrie aurait donc pour origine une protéobactérie et le chloroplaste (plaste des végétaux de la lignée verte) une cyanobactérie. Plusieurs hypothèses co-existent quant à l'explication de l'origine des organites intra-cellulaires (voir Margulis et al., 2000) dont une des plus récentes impliquant une archaebactérie anaérobie, une α -protéobactérie et d'autres bactéries et virus est présentée par Davidov et Jurkevitch en 2009 (**Fig.4**).

Fig.4 – Exemple de scénario sur l'origine des Eucaryotes basé sur la prédation.

(a) une petite bactérie aérobie, prédatrice facultative pénètre le périplasma de l'hôte archaéen anaérobie.

(b) sous des conditions environnementales favorables, le prédateur ne consomme pas sa proie. Une relation mutualiste se met en place et la bactérie se multiplie dans le périplasma de l'hôte. Cette relation serait basée sur la détoxification de l'oxygène et la syntrophie des sulfures, permettant à l'hôte de survivre dans un environnement de plus en plus riche en oxygène. En échange, l'Archaea hôte fournit un « abri » et les ressources essentielles à son partenaire (matière organique et sulfures réduits).

(c) finalement, la membrane cytoplasmique de l'hôte se transforme en membrane interne à l'origine de certains organites (noyau, réticulum endoplasmique...). Dans le même temps, le métabolisme de l'hôte est dépassé par les fonctions bactériennes du symbiote. L'ATP produite par les mitochondries alimente l'augmentation et la complexification des génomes et de la taille de la cellule. Puis les transferts latéraux de gène (LGT) des mitochondries et autres bactéries et virus contribuent au répertoire génétique nucléaire.



Outre ces procaryotes devenus organites fonctionnels des eucaryotes, internalisés il y a des milliers d'années et parfaitement intégrés d'un point de vue évolutif, il existe d'autres niveaux d'intégration de la symbiose. *Placida dendritica* ou *Elysia chlorotica* (**Fig.5**) sont des Mollusques Opisthobranches (communément appelés limaces de mer). Ces gastéropodes possèdent une particularité étonnante : ils sont photosynthétiques. En fait, ils se nourrissent d'algues, par la suite phagocytées par les cellules intestinales de l'animal. La paroi cellulaire de l'algue est digérée mais la cellule de l'hôte va conserver les chloroplastes, organites symbiontes de l'algue, en son sein. Les chloroplastes resteront parfaitement fonctionnels, et ce jusqu'à plusieurs mois selon l'hôte et les conditions environnementales, ce qui est un phénomène extrêmement rare (Rumpho et al., 2000, Evertsen et al., 2006). En temps normal, un chloroplaste extrait de sa cellule mère est inefficace très rapidement (les réactions chimiques ne persistent souvent que quelques jours selon Trench et al., 1975). Il y a donc une sorte de symbiose entre ces hôtes et les chloroplastes, l'hôte étant dépendant du camouflage et des nutriments acquis grâce aux symbiontes. Ce transfert de symbiontes pourrait faire penser à une étape d'internalisation précédant l'intégration évolutive d'endosymbiontes par la limace de mer suite à un changement d'hôte puisque les symbiontes (chloroplastes) sont toujours fonctionnels.

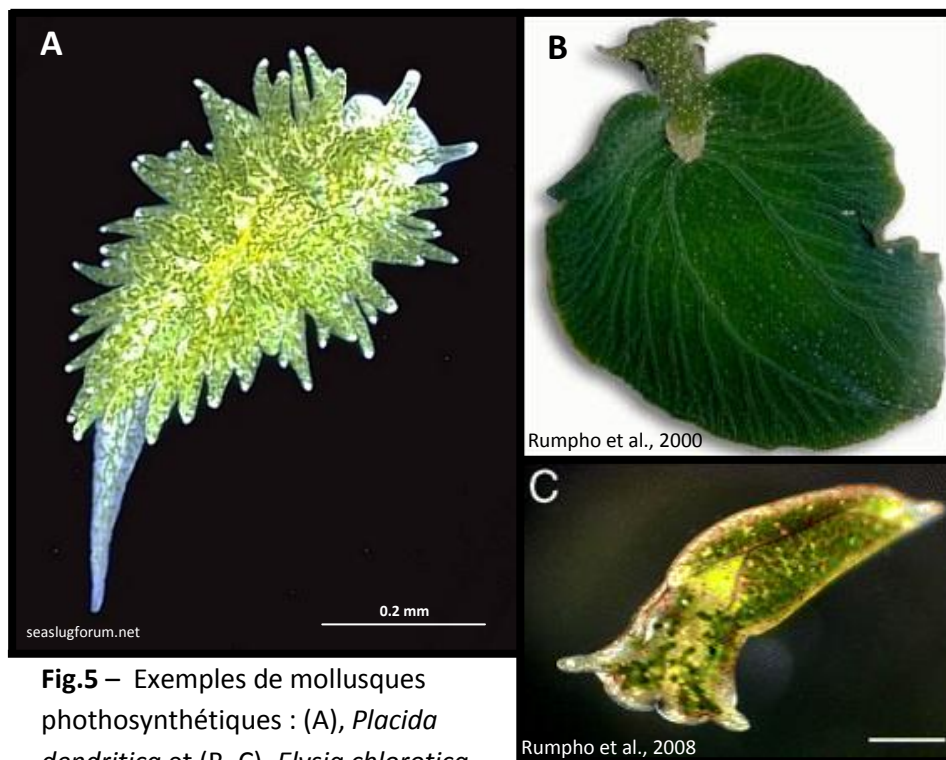


Fig.5 – Exemples de mollusques photosynthétiques : (A), *Placida dendritica* et (B, C), *Elysia chlorotica*.

Dans certains cas, les symbiontes sont libres dans les tissus de l'hôte (peut-être pas encore internalisés) comme chez les lichens (**Fig.6**), résultant de l'association d'un champignon et d'algues unicellulaires. Les tissus du mycélium ont subi quelques adaptations au cours de l'évolution de cette

symbiose. Les algues se trouvent parmi les hyphes, sous le cortex mycélien. L'association forme un thalle dont l'organisation est proche de celle d'un méristème végétal (Sanders, 2006). La mise en place du thalle est coordonnée pour les deux partenaires et leur cycle reproducteur est synchronisé. Des modifications sont observées dans le cadre d'une association par rapport au mode de vie non symbiotique : par exemple, les hyphes fongiques du lichen présentent une ramification plus prononcée pour augmenter la surface d'échange avec les algues unicellulaires et la sporulation chez certaines souches du photobionte *Trebouxia* est réduite (Gorbushina et al., 2005). L'hôte apporte la protection, le support, les sels minéraux et l'humidité au symbionte et celui-ci fournit les nutriments issus de la photosynthèse au champignon. Les lichens sont une association symbiotique très efficace et aboutie ; elle est durable et reproductible. Les lichens forment un groupe d'organismes pionniers en ce qui concerne la colonisation de nouveaux écosystèmes parfois hostiles. Les lichens encroûtant par exemple permettent de dissoudre la roche grâce à leurs sécrétions acides et ainsi de commencer le travail de fertilisation du milieu.

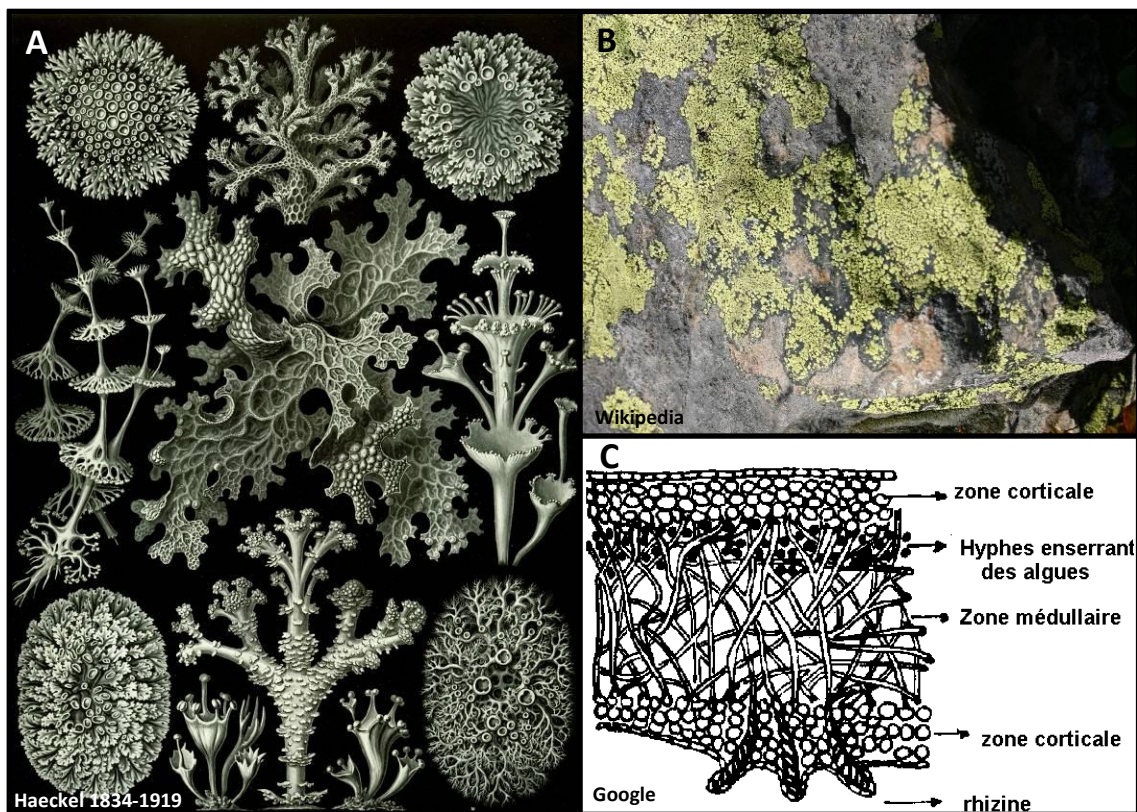


Fig.6 – Les lichens : (A) différentes morphologies ; (B) lichen crustacé *Rhizocarpon* sp. ; (C) schéma d'une coupe longitudinale d'un lichen crustacé.

[Les symbioses ou la colonisation réussie des environnements extrêmes](#) - Certains environnements sont qualifiés d'extrême par l'Homme (et pour l'Homme puisqu'il est le référentiel par défaut). Ces écosystèmes extrêmes peuvent afficher une ou plusieurs des conditions suivantes : oligotrophie, peu ou pas de lumière donc pas d'énergie provenant de la photosynthèse, pH extrême

(très alcalin ou très acide), température extrême (très haute ou très basse), pression, variations rapides des conditions environnementales, faible oxygénation, toxicité. Pour vivre sous de telles conditions, considérées comme hostiles à la vie dans les cas les plus extrêmes, cela nécessite une adaptation des organismes. Il peut s'agir d'adaptations évolutives (génétiques) de l'espèce elle-même, mais aussi d'adaptations grâce à une association avec un autre organisme. Dans le cas d'une association, il s'agit en général de mutualisme ou de symbiose au sens strict. *Riftia pachyptila*, annélide des sources hydrothermales marines profondes, en est une bonne illustration. Il vit dans un environnement oligotrophe, en absence d'énergie lumineuse, sous une importante pression hydrostatique (plusieurs dizaines de MegaPascals), dans un environnement pauvre en oxygène, chimiquement agressif et subissant de fortes variations thermiques et chimiques. Sa symbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes dans son trophosome lui permet d'obtenir tous les nutriments nécessaires à sa croissance, et ce sans système digestif. Les composés chimiques (notamment l'hydrogène sulfuré, Wilmot et Vetter, 1990) filtrés par les branchies de l'animal sont transportés vers les bactériocytes du trophosome grâce à l'hémoglobine spécifique du ver. L'hydrogène sulfuré est un composé très toxique pour les organismes possédant une hémoglobine. Cette molécule est un compétiteur de l'oxygène qui se fixe de façon irréversible sur l'hémoglobine entraînant à forte dose une incapacité respiratoire. Pour pouvoir fournir une des sources d'énergie à ses symbiotes, l'hémoglobine de *R. pachyptila* est donc capable de fixer l'hydrogène sulfuré de façon réversible et indépendamment de l'oxygène sur une même hémoglobine (Arp et al., 1987 ; Zal, 1998 ; Zal et al., 1998). Les symbiotes utilisent alors cette énergie chimique, habituellement toxique, pour la fixation du carbone et la synthèse de matière organique. La matière organique ainsi produite est une source nutritive pour l'hôte. Ainsi, *R. pachyptila* contourne les difficultés liées à cet écosystème extrême grâce à une association avec des micro-organismes chimiosynthétiques, producteurs primaires dans cet environnement, et à certaines adaptations physiologiques. Le niveau d'intégration de cette symbiose avec son hôte est relativement élevé puisqu'elle est de type intracellulaire à organe spécialisé (le trophosome). Dans ce même environnement, le ver polychète *Alvinella pompejana* est un exemple d'épibiose (ou ectosymbiose). L'épibiose est une relation mal connue qui pourrait être selon les cas du commensalisme ou du mutualisme. C'est-à-dire que les épibiontes sont extracellulaires, à l'intérieur de l'hôte (par exemple fixés à la paroi des cellules intestinales) ou à l'extérieur de l'hôte comme c'est le cas chez *A. pompejana*. Cet animal est un ver tubicole qui possède de nombreuses soies dorsales colonisées par des bactéries filamenteuses (Desbruyères et al., 1998). Dans le cas des épibioses, il n'est pas rare que les relations trophiques entre les épibiontes et leur hôte demeurent hypothétiques. Ceci s'explique par la simple définition de l'épibiose : c'est une association extracellulaire. De ce fait, par rapport à une endosymbiose, il est plus difficile de

déterminer les épibiontes spécifiques de l'hôte (par rapport aux micro-organismes opportunistes et environnementaux) et les échanges qu'ils entretiennent avec l'hôte.

1.4 - Pérennité des symbioses : de la descendance familiale à l'intégration évolutive

Acquisition et transmission des symbiontes - Pour qu'une symbiose s'établisse, il doit y avoir acquisition des symbiontes à chaque génération. Et pour que cette relation soit reproductible, cela nécessite une transmission des symbiontes. Ces événements clés font appel à des processus complexes de reconnaissance impliquant bien souvent des cascades de gènes divers et/ou le système immunitaire.

Il existe deux types d'acquisition/transmission des symbiontes. S'ils proviennent de l'environnement, il s'agit d'une transmission horizontale, ce qui n'empêche pas forcément la conservation d'une certaine spécificité hôte-symbionte comme dans le cas de l'endosymbiose très évoluée de *R. pachyptila* qui pourtant est à transmission horizontale. S'ils sont hérités d'un parent (ou des deux), il s'agit d'une transmission verticale. Ceci implique par définition une co-évolution et une forte spécificité hôte-symbionte car il y a synchronisation des cycles de reproduction. Cela suppose une certaine efficacité d'association puisqu'elle perdure dans le temps, allant parfois jusqu'à plusieurs centaines de millions d'années dans le cas des insectes hémiptères appartenant au sous-ordre *Auchenorrhyncha* et d'un de leurs deux symbiontes « *Candidatus Sulcia muelleri* » (Moran et al., 2005a). Cependant, l'acquisition horizontale des symbiontes peut avoir certains avantages. L'efficacité de l'association varie en fonction des conditions environnementales puisque les souches en présence peuvent ne pas être les mêmes. De plus, lorsque l'hôte peut accueillir une communauté de symbiontes, il peut y avoir une sélection des symbiontes en fonction des besoins de l'hôte ce qui augmente la valence écologique de l'association. Par exemple, *Convoluta roscoffensis* (**Fig.7**) est un petit plathelminthe en symbiose obligatoire avec l'algue verte unicellulaire *Tetraselmis*. Le symbionte est acquis horizontalement par les juvéniles au cours du passage au stade adulte. Les juvéniles ont un tube digestif avec un seul orifice qui assure les fonctions de bouche et d'anus. Chez l'adulte, le tube digestif n'est plus fonctionnel. La nutrition a lieu grâce à la présence de l'algue photosynthétique qui lui fournit des nutriments. Les symbiontes de *C. roscoffensis* sont du sous-genre *T. (Tetraselmis)* sp. mais il existe un site en Grande-Bretagne où les symbiontes peuvent être *T. (Tetraselmis)* sp. ou *T. (Prasinocladia)* sp. Il s'avère que *T. (Tetraselmis)* sp. libère quatre fois plus de photosynthétats que *T. (Prasinocladia)* sp. et que cette différence d'efficacité se traduit aisément par des observations en milieu naturel (Douglas, 1998). Les animaux associés à *T. (Prasinocladia)* sp. sont plus petits et moins féconds que ceux associés à *T. (Tetraselmis)* sp. En laboratoire, les juvéniles grandissent plus vite

avec *T. (Tetraselmis) sp.* qu'avec *T. (Prasinocladia) sp.* (Douglas, 1985). Douglas a aussi montré *in vitro* que la double association n'est que transitoire. Des juvéniles axéniques (dépourvus de micro-organismes) exposés aux deux symbiontes posséderont les deux algues pendant un temps restreint : en trente jours, la population de symbiontes sera exclusivement constituée de *T. (Tetraselmis) sp.*

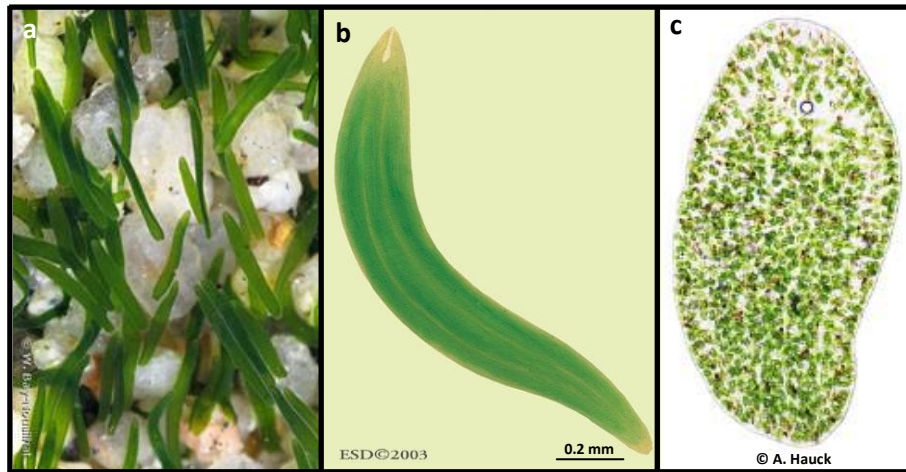


Fig.7 – *Convoluta roscoffensis*. (a), observation *in situ*; (b), observation à la loupe binoculaire; (c), observation en microscopie photonique.

Le mode de transmission (verticale ou horizontale) dépend en général de l'accessibilité des symbiontes à l'hôte ou à ses cellules reproductrices. Dans le cas de la transmission verticale, c'est-à-dire transmission des symbiontes à la descendance par les parents, les procédés sont complexes et dans la majorité des cas, il y a nécessité pour les symbiontes d'avoir accès au système reproducteur (canal reproducteur, cellules germinales, œuf, larve). La transmission se fera de manière extracellulaire ou intracellulaire. Dans ce qui peut être qualifié de symbiose évoluée (lorsque les symbiontes sont intracellulaires) la transmission se fait souvent via la mère. C'est un phénomène courant dans le cas des endosymbioses qui peut se manifester sous deux formes. Au moment de la reproduction, les symbiontes migrent vers les oocytes et sont alors à l'intérieur de la cellule-œuf. Dans ce cas, les hôtes sont colonisés dès les stades les plus précoces de la croissance (avant le stade larvaire). Les symbiontes peuvent aussi se trouver à l'extérieur de l'œuf, dans une gangue de polysaccharides. Les larves sont donc axéniques lors de leur développement. Les symbiontes coloniseront leur hôte suite à l'ingestion de la gangue de l'œuf par la larve après l'éclosion. Chez les vers de terre de la famille des Lombricidae, la transmission a lieu lors de l'accouplement, via l'albumine contenue dans la capsule de l'œuf. Les symbiontes sont extracellulaires et migrent dans les cellules de l'hôte aux premiers stades de l'embryogénèse (Davidson et Stahl, 2008). La transmission verticale des symbiontes chez les démosponges est également particulière. Les porifères (ou éponges) sont caractérisés par un niveau d'organisation simple des tissus. Ils consistent en deux couches de cellules le pinacoderme (ou ectoderme) et le choanoderme (ou endoderme)

entre lesquelles se trouve la mésogée, sorte de gelée dans laquelle évoluent librement les amibocytes (cellules mobiles assurant le transfert d'éléments nutritifs). C'est dans cette matrice lâche jouant un rôle analogue du tissu conjonctif que les symbiontes (extracellulaires) sont observés. En effet, de nombreuses démosponges vivent en association avec d'importants consortia microbiens dont la composition et la quantité diffèrent selon l'habitat de l'hôte. Chez les individus adultes, les micro-organismes représentent 40 à 60 % de la biomasse (Schmitt et al., 2007). Il existe une transmission verticale des symbiontes dont le processus est différent selon que la démosponge est ovipare ou vivipare. Des observations microscopiques révèlent la présence de symbiontes dans les embryons/larves chez les vivipares (Ereskovsky et al., 2005). Mais chez les ovipares, ceux-ci sont retrouvés dans les oocytes (Sciscioli et al., 1994), c'est-à-dire intracellulaires. Il y a donc un transfert des symbiontes extracellulaires de la mésogée vers les oocytes. Puis lors de la croissance de l'hôte, les symbiontes passeront d'un stade intracellulaire à un stade extracellulaire au cours de la mise en place des feuillets du derme.

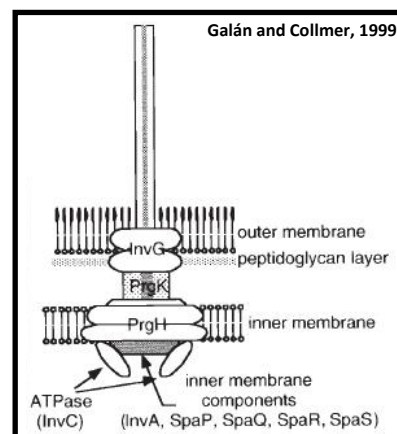
Il existe également un mode de transmission des symbiontes qui ne fait pas intervenir le système reproducteur des parents. C'est en quelque sorte une exception dans la transmission verticale. La trophallaxie (orale ou anale) est un processus très répandu chez les insectes vivant en société comme les fourmis ou les termites. Elle permet notamment de communiquer et joue un rôle important dans la reconnaissance des membres et le maintien de la hiérarchie grâce aux phéromones au sein de cette communauté. La trophallaxie proctodéale (ou anale) se traduit par l'ingestion de réjections anales et de certaines pelotes de fèces des adultes par d'autres membres de la communauté. La trophallaxie stomodéale (ou orale) consiste à échanger des réjections liquides « bouche à bouche » entre individus. Outre le rôle de la trophallaxie dans la communication entre les membres d'une même société organisée, elle joue aussi un rôle dans les communautés symbiotiques telles que les termites ou les blattes xylophages dont les symbiontes font partie d'une population épibionte du système digestif nécessaire pour la digestion du bois dont l'hôte se nourrit. L'acquisition des épibiontes par les nouveau-nés des cafards *Cryptocercus* et *Salganea* par exemple se fait par trophallaxie proctodéale pour le premier et stomodéale pour le second (Nalepa et al., 2008). Dans ces deux exemples, les nymphes sont élevées dans un système de soin bi-parental et sont dépendantes de cette relation. Dans le cas où elles sont retirées des soins de leurs parents, l'acquisition des épibiontes ne se fait pas et les nymphes meurent. Il s'agit donc bien d'un mode de transmission verticale des symbiontes.

[Implications moléculaires des interactions durables](#) - Les Êtres Vivants sont naturellement prédisposés à répondre aux attaques de l'environnement extérieur, quel qu'en soit leur type. D'un point de vue moléculaire, c'est le système immunitaire qui en est le principal acteur. Les mécanismes

de défense reposent sur un système de reconnaissance de protéines étrangères qui entraîne une réponse cellulaire impliquant des cascades de gènes. L'hôte répondra par différents mécanismes : réponse cellulaire et/ou humorale. Dans ce contexte, les interactions durables représentent un phénomène intéressant. L'hôte est colonisé par des « corps étrangers » possédant des protéines membranaires classiquement reconnues par son système immunitaire, et pourtant, des relations durables et reproductibles dans le temps peuvent se mettre en place. Parallèlement, lorsqu'une symbiose se met en place, les mécanismes de reconnaissance hôte-symbiotes impliqués sont semblables à ceux sollicités dans le cas du déclenchement de la défense immunitaire. Ces mécanismes sont basés sur la reconnaissance de lipopolysaccharides ou de protéines membranaires particuliers grâce au système PGRP (protéines de reconnaissance du peptidoglycane = peptidoglycan recognition proteins, surtout utilisé par l'hôte).

Certains systèmes de sécrétion jouent aussi un rôle important dans les interactions entre les deux partenaires : ce sont les systèmes de type seringues moléculaires (utilisés par les symbiotes), majoritairement le système de sécrétion de type III (SST3, **Fig.8**).

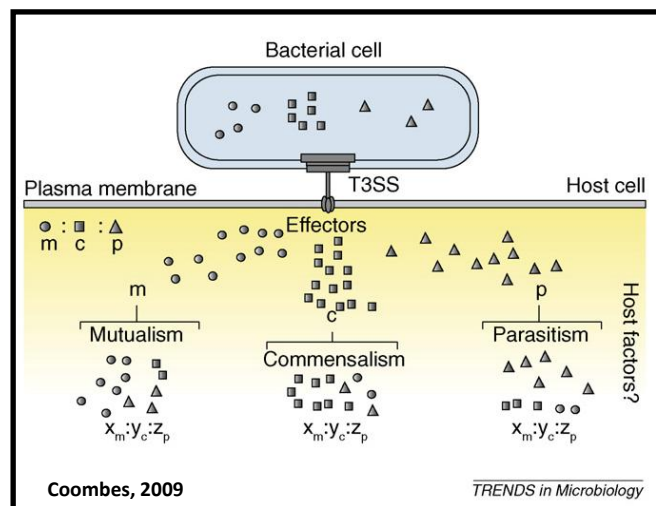
Fig.8 - Schéma représentant le complexe en seringue du système de sécrétion de type III de *Salmonella typhimurium*, entérobactérie pathogène, et ses composants putatifs.



Ces systèmes de sécrétion sont habituellement exprimés chez les bactéries pathogènes lors de la phase d'invasion cellulaire. Dans ce cas, ces complexes protéiques permettent l'injection des facteurs de virulence dans la cellule-cible afin de faciliter l'invasion cellulaire. Les gènes codant les SST3 (seringue et effecteurs) sont organisés en clusters, souvent dans les îlots de pathogénicité du génome bactérien. Mais il a été montré récemment que les SST3 sont également exprimés par les bactéries mutualistes. Il est alors suggéré qu'une co-évolution hôte-parasites aurait permis à ces micro-organismes de développer une relation commensale ou mutualiste. Les mécanismes moléculaires impliqués dans les symbioses ou la pathogénicité seraient alors similaires (Goebel et Gross, 2001 ; Hentschel et Steinert, 2001). Les travaux de Dale et collaborateurs en 2002 montrant l'expression de gènes codant un type de SST3 (homologue à celui exprimé lors de l'invasion par des bactéries pathogènes) par les endosymbiotes du charançon *Sitophilus zeamais* soutiennent cette

hypothèse. Ils suggèrent qu'un SST3 a été adapté dans le contexte du mutualisme pour maintenir une association intracellulaire permanente entre les endosymbiontes et leur hôte (Dale et al., 2002). En effet, lors de la métamorphose de l'insecte, le bactériome de la nymphe (organe spécialisé contenant les endosymbiontes) est disloqué et les symbiontes migrent le long du tractus digestif sous forme libre pour re-former les bactériomes dans les caeca. Pendant la métamorphose où les symbiontes passent de l'état intracellulaire à la forme libre pour de nouveau être intracellulaires, les bactéries surexpriment les gènes *inv/spa* (codant un SST3) et l'hôte surexprime les gènes codant des PGRP (Anselme et al., 2006). Il y a donc une double réaction (hôte et symbiontes) pour le maintien de cette association mutualiste. En 2009, Coombes introduit d'autres paramètres sur la base de l'hypothèse précédente. Sa théorie repose sur les effecteurs impliqués dans la réaction de défense de l'hôte lorsque son système de reconnaissance est sollicité. Pour Coombes, qu'il s'agisse d'un parasite, d'un commensal ou d'un mutualiste, les effecteurs seraient les mêmes, quel que soit le type de sollicitation, mais exprimés dans des quantités différentes. Cela crée donc une modulation de la réponse de l'hôte en fonction du stimulus (**Fig.9**).

Fig.9 - Schéma représentant les différentes relations symbiotiques impliquant un système de sécrétion de type III lors de l'attachement de la cellule bactérienne à la cellule-hôte. L'hypothèse étant que les états de mutualisme, commensalisme ou parasitisme sont générés par un unique panel d'effecteurs exprimés en réponse à un unique signal pour l'hôte (Coombes, 2009).



La présence constante de micro-organismes dans le cadre des interactions durables sollicite en permanence le système immunitaire de l'hôte (ainsi qu'un certain nombre de fonctions cellulaires chez les symbiontes telles que l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans les fonctions d'attachement cellulaire ou d'invasion). Cela a un coût énergétique. Tous les métazoaires assignent une partie de leurs dépenses énergétiques de base pour le système immunitaire (reconnaissance des antigènes lors de la nutrition par exemple). L'existence d'une association avec un organisme étranger implique un surcoût énergétique pour l'hôte qui doit contrôler le pouvoir invasif, la division et la croissance des symbiontes en permanence. Il est d'ailleurs parfois difficile de situer la frontière entre mutualisme et parasitisme dans le cadre des interactions durables obligatoires (Combes, 1995). La sélection naturelle favorise donc les individus ayant une balance

optimale entre les défenses immunitaires et les autres paramètres jouant sur la dynamique de l'espèce (par exemple la reproduction ou le rendement de ponte, Siva-Jothy et al., 2005). Les symbiotes sont également confrontés à un problème de sélection. Les SST3 sont très souvent obtenus par transfert horizontal avec d'autres micro-organismes. Un endosymbiote, transmis verticalement entre les générations d'hôtes, réduit fortement ses possibilités d'acquérir les gènes codant des molécules de type *système de sécrétion* par transfert horizontal par rapport à un symbiote transmis horizontalement, donc en contact avec l'environnement extérieur (Dale et al., 2001).

Tout comme la contribution non négligeable du système immunitaire dans les interactions durables, l'analyse du transcriptome de symbiotes révèle une surexpression de gènes faisant classiquement partie du « heat shock regulon » codant des protéines chaperones (Wilcox et al., 2003), tel que *GroEL*. Les chaperones ont pour rôle de stabiliser les protéines intracellulaires. Plutôt que d'inférer un nouveau rôle à la protéine GroEL, Dale et Moran en 2006 suggèrent que le surinvestissement des symbiotes dans les mécanismes de stabilisation des protéines est une évolution pour compenser l'accumulation des mutations qui réduisent la stabilité des protéines, c'est-à-dire pour le maintien des fonctions essentielles du symbiote (surtout quand il est intracellulaire). Ceci est une conséquence directe de l'évolution vers la symbiose obligatoire.

[Interactions durables et évolution](#) - La symbiose est très complexe sur le plan génomique. Si l'on considère l'entité symbiotique (l'ensemble des partenaires d'une association), celle-ci contient plusieurs génomes : celui de l'hôte, ceux des mitochondries et chloroplastes si c'est un eucaryote et celui des symbiotes (qui peuvent représenter plusieurs espèces impliquées dans une même association). Cela permet à l'hôte d'être sujet à des forces évolutives qui n'existeraient pas si les génomes étaient fusionnés (Moran, 2006). Certaines interactions existent depuis plusieurs centaines de millions d'années (comme l'endosymbiose entre les insectes hémiptères appartenant au sous-ordre *Auchenorrhyncha* et « *Candidatus Sulcia muelleri* », Moran et al., 2005). Dans le cas des endosymbioses à transmission verticale, la possibilité de transferts horizontaux de gènes entre les symbiotes et d'autres organismes environnementaux est très réduite. De plus, à chaque génération, seuls quelques symbiotes sont transmis ce qui limite encore plus la diversité génétique (phénomène de « bottleneck »). La co-évolution entre le symbiote et l'hôte est donc très forte. Le génome des symbiotes transmis horizontalement est plus « dynamique ». Par exemple, les génomes de *Buchnera* et *Blochmannia* (symbiotes à transmission verticale des fourmis charpentières) ne révèlent aucun réarrangement ou insertion de gènes depuis des millions d'années de divergence, et ils n'ont aucun bactériophage ou élément génétique mobile. Par contre, chez les symbiotes facultatifs des insectes dont la transmission est en général horizontale, les bactériophages sont

associés à l'acquisition de gènes nouveaux et les séquences répétées pourraient faciliter les recombinaisons entre souches rencontrées dans un hôte co-infecté (Moran, 2006 ; Moran et al., 2008). Les analyses moléculaires révèlent souvent une co-évolution et une co-spéciation forte entre les associés, dans le cadre des symbioses obligatoires. Dans les symbioses non obligatoires et/ou à transmission horizontale, la co-évolution n'est pas toujours aussi marquée. L'impact des interactions durables se traduit par des modifications plus ou moins évidentes des associés. Chez les hôtes, elles touchent plutôt son anatomie (ou moins évident, la machinerie cellulaire) par la mise en place d'organes spécialisés tels que les bactériomes chez les insectes, le trophosome chez *R. pachyptila* ou les nodosités chez les légumineuses. Mais elles peuvent aussi se traduire par la disparition de certains organes comme le tube digestif dans de nombreuses symbioses trophiques. Chez les symbiotes, ces modifications acquises au cours de l'évolution de l'association sont plutôt observées au niveau du génome. D'une manière générale, lorsqu'il s'agit d'une endosymbiose obligatoire, et d'autant plus si elle est ancienne, une réduction génome du symbiote est observée (<1 mégabase pour une endosymbiose primaire ancienne, Moran et al., 2005b) ainsi qu'une réduction de sa richesse en guanine et cytosine 18-28 % G+C pour une endosymbiose primaire ancienne, Moran et al., 2005b). De nombreux gènes essentiels pour un organisme libre mais codant des fonctions redondantes avec celles de l'hôte (comme certains éléments de la machinerie de réplication ou la biosynthèse d'éléments fournis par l'hôte) sont perdus, comme chez les symbiotes *Carsonella* et *Sulcia* par exemple (Moran et al., 2008). Le constat fréquent d'une longue co-spéciation hôte-symbiote (peut-être peut-on parler de conséquence) est une complémentarité fonctionnelle des associés comme c'est observé dans le couple *Glossinidia* (mouche tsé-tsé) / *Wigglesworthia* (endosymbiote) (Moran, 2006). *Wigglesworthia* a conservé dans son génome de 0.7 mégabases les fonctions essentielles complétant les déficiences nutritionnelles dues au régime de son hôte (biosynthèse de vitamines mais perte des fonctions de biosynthèse d'acides aminés fournis par l'hôte). Sous forme libre dans l'environnement, la plupart des symbiotes pourraient difficilement survivre (voire pas du tout pour certains) en raison de leurs nombreuses auxotrophies pour des éléments essentiels ou de leur incapacité à se dupliquer. L'autre symbiote de *Glossinidia*, *Sodalis glossinidius*, s'est associé plus récemment à l'hôte et possède un génome plus grand (4.1 mégabases) et plus dynamique (gènes de phages, éléments génétiques mobiles) que *Wigglesworthia*. Mais près de la moitié de ses gènes sont inactivés (principalement à cause d'introns ou de mutations, Toh et al., 2006) ce qui pourrait représenter un état de transition entre une bactérie d'origine pathogène par exemple (*Sodalis* possède des gènes codant des SST3) vers une bactérie mutualiste (Dale et Moran, 2006). A l'extrême, si l'on considère l'endosymbiose intégrée « parfaite » que sont les mitochondries, le constat est identique : les gènes inactivés ou inutiles disparaissent rapidement et les génomes les plus petits sont avantagés (Sélosse et al., 2001) certainement parce qu'ils sont répliqués plus vite et à

moindre coût. « *En revanche, dès lors qu'il existe une phase libre des symbiotes comme chez les rhizobiums par exemple, la nécessité d'une vie autonome rend caduque cette sélection* » (Sélosse, 2009). Dans cette course à la réduction des génomes d'endosymbiotes, certains gènes sont transférés dans le génome de l'hôte ce qui contribue à sa diversification génétique.

Les symbioses sont une bonne illustration de la théorie de la reine rouge. Celle-ci part de la constatation par Van Valen que la probabilité d'extinction d'un groupe d'êtres vivants est constant au cours des temps géologiques. Leigh Van Valen (né en 1935) est un biologiste évolutionniste de l'Université de Chicago. Il postule dans la théorie de la reine rouge en 1973 que le biotope se modifierait en permanence. Ainsi l'effort d'adaptation de la biocénose serait toujours à recommencer, et l'extinction des espèces toujours aussi probable. Ce concept important dans le domaine de l'évolution tire son nom du deuxième volet d'*Alice au pays des merveilles : De l'autre côté du miroir*, roman de Lewis Carroll. Lancée dans une course effrénée sur un tapis roulant avec la reine, Alice lui demande : « *Mais, Reine Rouge, c'est étrange, nous courons vite et le paysage autour de nous ne change pas ?* ». La reine répond : « *Nous courons pour rester à la même place.* ». Cette métaphore illustre ce qui est couramment appelé la course aux armements des Êtres Vivants. Dans le cas des symbioses, il faut continuellement développer stratégies pour augmenter l'efficacité des relations entre individus, que ce soit au sein de l'association symbiotique (systèmes de reconnaissance hôte-symbiote, transmission des symbiotes...) mais aussi au sein de l'écosystème afin d'être toujours plus compétitif avec les populations concurrentes.

2 - Les écosystèmes hydrothermaux marins profonds

2.1 - Formation d'un écosystème hydrothermal

Les écosystèmes hydrothermaux marins profonds ont été découverts au niveau de la dorsale des Galàpagos en 1977 (Corliss et al., 1979) par le submersible américain *Alvin*. Les fonds marins profonds, habituellement considérés comme désertiques, se trouvent être de véritables oasis de vie au niveau des sites hydrothermaux. Ces écosystèmes particuliers sont la résultante de la tectonique des plaques. Les mouvements tectoniques provoquent, entre autres, des déformations de la croûte terrestre. Dans les océans, cette activité est bien visible au niveau des dorsales. C'est une zone d'accrétion océanique active provoquant l'écartement des plaques et la remontée de matière en fusion. Ces mouvements créent des failles transformantes de part et d'autre du rift. L'eau de mer (froide, environ 2-3 °C) va alors s'infiltrer dans le plancher océanique (**Fig.10**).

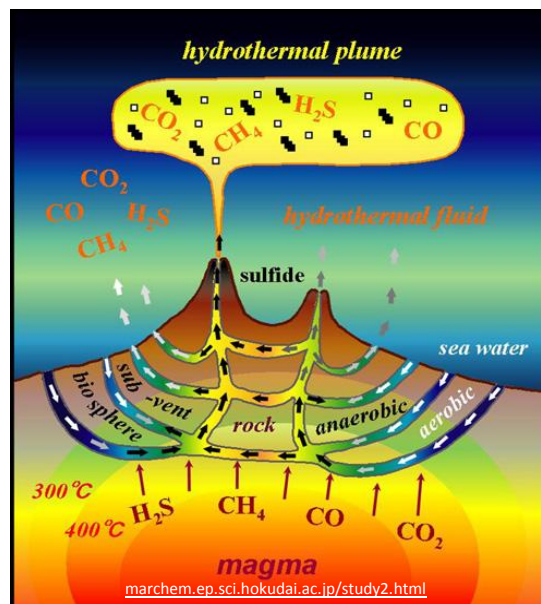


Fig.10 – Représentation schématique du fonctionnement d'une source hydrothermale marine profonde.

A proximité de la matière en fusion (magma ou manteau affleurant), elle se réchauffe. La pression et la température qu'elle atteint dans ces zones modifient les propriétés physico-chimiques de l'eau de mer, notamment en augmentant la capacité de solubilisation des composés chimiques. Elle se charge alors en diverses substances telles que des gaz (CH₄, H₂, CO₂, H₂S), des métaux lourds et des éléments chimiques dont la composition dépend des roches traversées. Le fluide hydrothermal ainsi produit est anoxique et souvent acide. Il peut atteindre une température de plus de 400 °C. Le contact avec l'eau de mer froide environnante va précipiter les différents minéraux qui vont alors former les cheminées hydrothermales. Ces sources hydrothermales étant situées à plusieurs centaines de

mètres de profondeur, la pression hydrostatique atteint de fait plusieurs dizaines de mégapascals. Ce sont des environnements très instables dans l'espace et dans le temps. En effet, ils ont pour origine l'activité tectonique de la croûte terrestre. Ils peuvent donc s'éteindre aussi vite qu'ils ont été créés mais peuvent aussi persister des centaines d'années. De même, leur activité (débit, température, composition du fluide émis) fluctue sur une échelle de temps plus réduite. Sur le plan spatial, ces écosystèmes sont définis par des gradients chimiques et thermiques concentriques autour des édifices hydrothermaux du fait de la nature radicalement différente du fluide hydrothermal et de l'eau de mer. Malgré ces conditions géochimiques extrêmes, les sources hydrothermales marines profondes présentent une biodiversité riche. L'étude de ces écosystèmes présente grand intérêt pour l'étude des origines du Vivant, sa connaissance, mais aussi pour la biotechnologie. Ils sont considérés comme une source potentielle de nouvelles molécules.

2.2 - Les sites hydrothermaux : localisation et considérations géochimiques

Les sites hydrothermaux marins profonds se trouvent principalement sur les zones de type dorsale océanique ou au niveau des bassins arrière-arc. Les régions les plus étudiées par la communauté scientifique internationale se trouvent le long de la dorsale est-Pacifique, le long de la dorsale médio-Atlantique (MAR pour Mid-Atlantic Ridge) ainsi qu'au niveau du point triple de l'océan Indien (**Fig.11**).

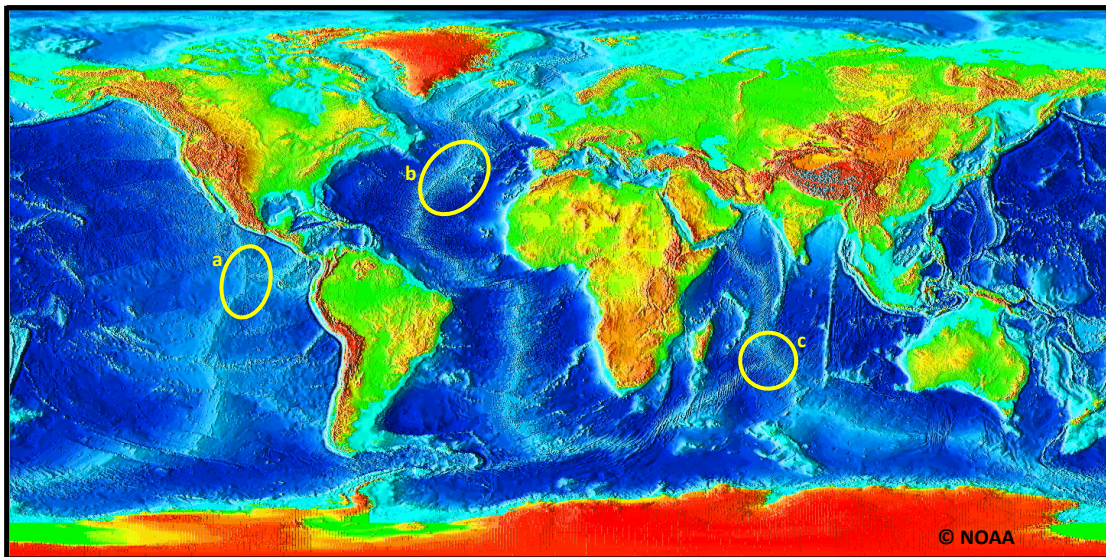


Fig.11 - Carte montrant le relief de la croûte terrestre, la répartition des dorsales océaniques et les principales zones d'étude des écosystèmes hydrothermaux marins profonds :
(a), ride est-Pacifique ; (b) ride médio-Atlantique nord ; (c) point triple de l'océan Indien.

La profondeur des champs hydrothermaux est un paramètre à prendre en compte dans la description de ces écosystèmes. Le long de la ride médio-Atlantique par exemple, le site Menez

Gwenn (MAR, 37°50'N) se trouve à -850 m, Rainbow (MAR, 36°14'N) à -2320 m, Logatchev (MAR, 14°45'N) à -3000 m, TAG (MAR, 26°N) à -3650 m et Ashadzé (MAR, 12°50'N) à -4100 m. La pression hydrostatique peut ainsi varier de plusieurs dizaines de mégaPascals d'un site à l'autre : ainsi, elle est de 8.5 MPa à Menez Gwenn, 23 MPa à Rainbow, 30 MPa à Logatchev, 36 MPa à TAG et 41 MPa à Aschadzé.

La composition géochimique du plancher océanique dans lequel s'infiltré l'eau de mer influence radicalement la composition des fluides émis. Il existe donc des écosystèmes aux conditions géochimiques très variables. Un site hydrothermal sera qualifié de « classique » quand l'eau de mer formant le fluide est en contact avec des roches de la croûte océanique (basaltes, riches en silice). Les fluides hydrothermaux seront enrichis en hydrogène sulfuré, en argon, en silice et appauvris en méthane (**Tab.2**). Il sera dit mantellique si l'eau s'infiltré dans une zone où le manteau affleure (péridotites et olivines, riches en fer). Les réactions chimiques à haute température avec ces roches, particulièrement la serpentinisation, et les gaz présents, comme les processus de type Fischer-Tropsch (production d'hydrocarbures à partir de monoxyde de carbone et de dihydrogène), vont enrichir les fluides en dihydrogène, méthane, monoxyde de carbone, fer, calcium, métaux lourds et molécules abiotiques à longues chaînes carbonées (hydrocarbures) mais ceux-ci seront appauvris en sulfures et en silice (**Tab.2**).

Tab.2 – Comparaison des concentrations de certains minéraux et gaz relevées dans les fluides purs de deux sites de la MAR : TAG, site « classique » et Rainbow, site mantellique (d'après Charlou et al., 2002).

	Eau de mer	TAG (26°N)	Rainbow (36°14'N)
Profondeur (m)		3670	2300
Température (°C)	2	321/290	365
pH	7.8	3.1	2.8
Si(OH) ₄ (mM)	<0.2	22.0	6.9
Cl (mM)	546	659	750
Br (μM)	838	880/1045	1178
Rb (μM)	1.3	10	36.9
Cs (nM)	2.3	110	333
Mg (mM)	53	0	0
Ca (mM)	10.2	26.0	66.6
Sr (μM)	87	99	200
Ba (μM)	0.14	>19	>67
Fe (μM)	<0.001	1640	24050
Mn (μM)	<0.001	1000	2250
Zn (μM)	0.01	46	115/185
H ₂ S (mM)	0	6.7	1.2
CO ₂ (mM)	2.30	2.9/3.4	16
CH ₄ (mM)	0.0003	0.124/0.147	2.5
CO (nM)	0.3	-	-
Ar (μM)	16	20/40	-
N ₂ (mM)	0.59	0.90/0.89	1.8
H ₂ (mM)	0.0004	0.15/0.37	16

Les compositions chimiques des différents fluides influencent les conditions de pH de ceux-ci. La plupart des écosystèmes hydrothermaux présentent des fluides acides dont le pH est souvent proche de 2-3 à la sortie du fumeur (Charlou et al., 2002). Mais certains sites peuvent être alcalins, comme le

site Lost City (**Fig.12B**) proche de la ride médio-Atlantique (-750 m, 30°N). C'est un site hors axe puisqu'il est éloigné d'environ 15 km de l'axe de la MAR. Les fluides hydrothermaux sont émis à des températures comprises entre 40 et 75°C seulement. Ces températures sont dues uniquement aux réactions exothermiques de serpentinisation et aux contraintes tectoniques dans la croûte sous-jacente. Le pH alcalin des fluides de Lost city (9-9,8) et la concentration en calcium sont typiques des fluides émanant de la serpentinisation des péridotites (Coleman, 1971 ; Barnes et al., 1972). L'alcalinisation des fluides précipite les carbonates (calcite et aragonite) et les hydroxydes (brucite) composant les édifices hydrothermaux de Lost City (Kelley et al., 2001). C'est donc un site dont la structure et les conditions géochimiques le distinguent parfaitement des autres sites hydrothermaux le long de l'axe de la MAR (**Fig.12**).

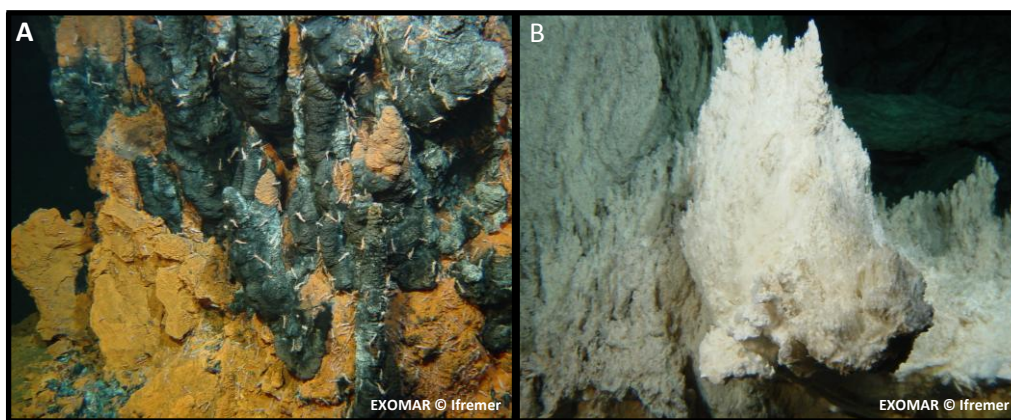


Fig.12 – Exemple de deux sites hydrothermaux contrastés de la MAR : (A) Rainbow (36°14'N), site chaud acide et (B) Lost City (30°N), site tiède alcalin.

L'activité des cheminées hydrothermales dépend de l'âge du site et de la distance qui le sépare de la source d'énergie qui réchauffe les fluides (chambre magmatique ou manteau terrestre par exemple). Ces facteurs influencent le débit de la cheminée et la température des fluides. Ils vont donc jouer sur la stabilité des écosystèmes hydrothermaux. En effet, ces environnements sont très instables du point de vue temporel, spatial ou géochimique. A proximité immédiate de la cheminée, les variations de débit des fluides se ressentiront par d'importantes variations des conditions géochimiques. A cela s'ajoute la localisation spatiale par rapport à la cheminée. Les fluides sont extrêmement chauds et concentrés en divers composés chimiques et particules minérales. Expulsés dans l'eau de mer froide et oxygénée, des gradients thermiques et chimiques se mettent en place de façon concentrique autour des cheminées actives. Sur un site chaud dont les fluides sont émis aux alentours de 300°C par exemple, la température de l'eau de mer à quelques mètres des édifices actifs est à 2°C. L'existence de tels gradients influence la répartition faunistique dans ce type d'écosystème en fonction des conditions géochimiques.

2.3 - Faune associée aux écosystèmes hydrothermaux

Répartition faunistique - Les conditions de vie dans les champs hydrothermaux atlantiques sont globalement semblables à celles des sites pacifiques. Il est donc compréhensible d'observer certaines similarités dans la diversité de la faune associée, en grande majorité inféodée aux écosystèmes hydrothermaux. Cependant, les sites hydrothermaux se distinguent par la présence de certaines espèces, souvent endémiques d'une localisation géographique plutôt que d'un site particulier (comme par exemple la crevette hydrothermale *R. exoculata*, endémique des sites de dorsale médio-Atlantique). La répartition faunistique hydrothermale diffère en fonction des gradients géochimiques autour des édifices actifs. Deux pôles peuvent être définis sur la base du gradient thermique : le pôle chaud (subdivisé en pôle chaud et pôle tiède), et le pôle froid. Le premier correspond à la zone dont l'intervalle de température est compris entre 20°C et les limites de la vie. Le pôle froid se situe dans un intervalle de températures plus proches de celles de l'eau de mer, c'est-à-dire de 2 à 10°C.

D'un point de vue microbiologique, les écosystèmes hydrothermaux regorgent d'une incroyable diversité : à une échelle géographique réduite à un simple champ hydrothermal, au niveau du pôle chaud se trouvent surtout les micro-organismes hyperthermophiles (optimum de croissance > 80°C), thermophiles (optimum de croissance > 50°C) et mésophiles (optimum de croissance > 20°C) (**Fig.13**). Les psychrophiles (optimum de croissance de 5 à 15°C) constituent la majeure partie de la population microbienne du pôle froid, c'est-à-dire de l'eau de mer.

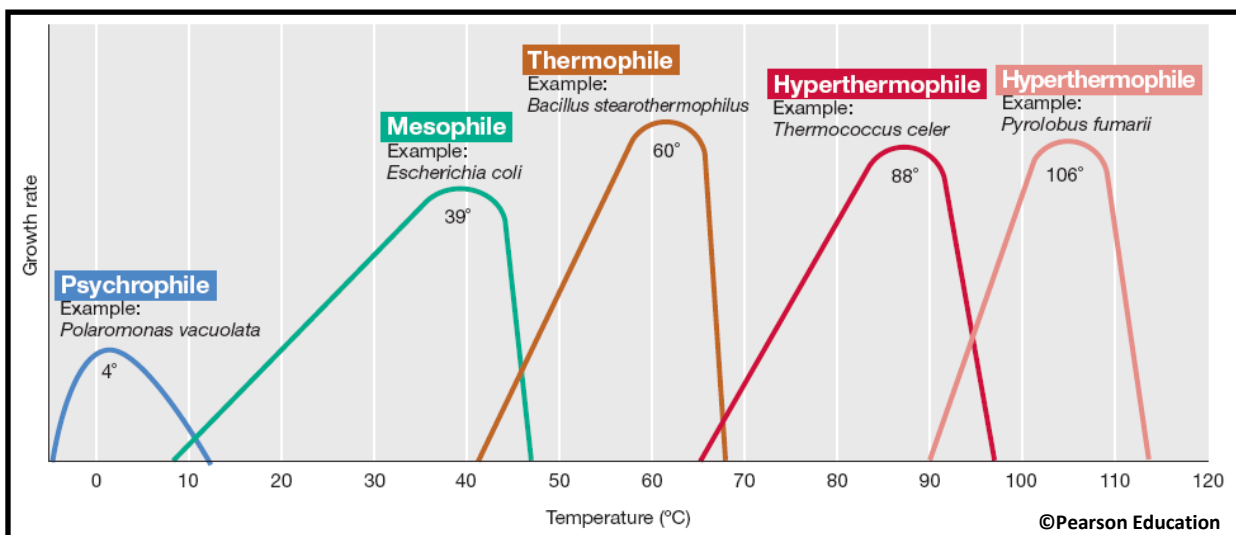


Fig.13 - Courbes de croissance de certains micro-organismes en fonction de la température.

Très peu de métazoaires vivent dans la partie la plus chaude de l'écosystème du pôle chaud, où les températures sont supérieures à 40°C. En effet, les limites de la vie animale se situent en-dessous de 45°C sur la base de la stabilité des protéines. Mais les alvinellidés (vers polychaetes tubicoles) sont

les animaux les plus thermotolérants après les tardigrades. *In situ*, ils vivent à des températures entre 40 et 50°C à l'intérieur de leurs tubes, fixés aux parois des cheminées actives mais ils pourraient supporter transitoirement des températures pouvant dépasser 60°C (Cary et al., 1998 ; Le Bris et al., 2005). Dans la partie tiède du pôle chaud correspondant aux températures de 15-30°C, la faune est constituée principalement de crevettes caridées de différentes espèces (*Rimicaris exoculata*, *Mirocaris fortunata*, *Chorocaris chacei*, *Alvinocaris markensis*). Sur certains sites de la ride médio-Atlantique, l'espèce *R. exoculata* est présente en population très dense et domine la macrofaune. Le pôle froid est quant à lui colonisé en grande partie par les mollusques bivalves tels que *Bathymodiolus* spp. ou *Calyptogena* spp. et par les vestimentifères comme *R. pachyptila* (sur les sites de la dorsale est-Pacifique uniquement) à la base des fumeurs. Certains gastéropodes, crustacés, poissons, échinodermes et gorgones trouvent également leur habitat à la base des édifices hydrothermaux mais en populations généralement réduites à quelques individus au mètre carré pour les plus importantes.

A une échelle géographique étendue à l'ensemble des sources hydrothermales marines profondes, la comparaison inter-sites révèle certaines similitudes. Par exemple, les modioles sont retrouvées aussi bien sur la ride est-Pacifique que sur la ride médio-Atlantique. Mais la macrofaune associée aux écosystèmes hydrothermaux comporte également des espèces endémiques. Les exemples les plus représentatifs sont *R. pachyptila* et les alvinellidés, endémiques des sites de la ride est-Pacifique et *R. exoculata*, endémique des sites de la ride médio-Atlantique (Fig.14). Des études sur la biogéographie de certaines espèces inféodées à l'hydrothermalisme permettent de retracer les événements évolutifs et la spéciation au sein de ces populations (Plouviez et al., 2009).

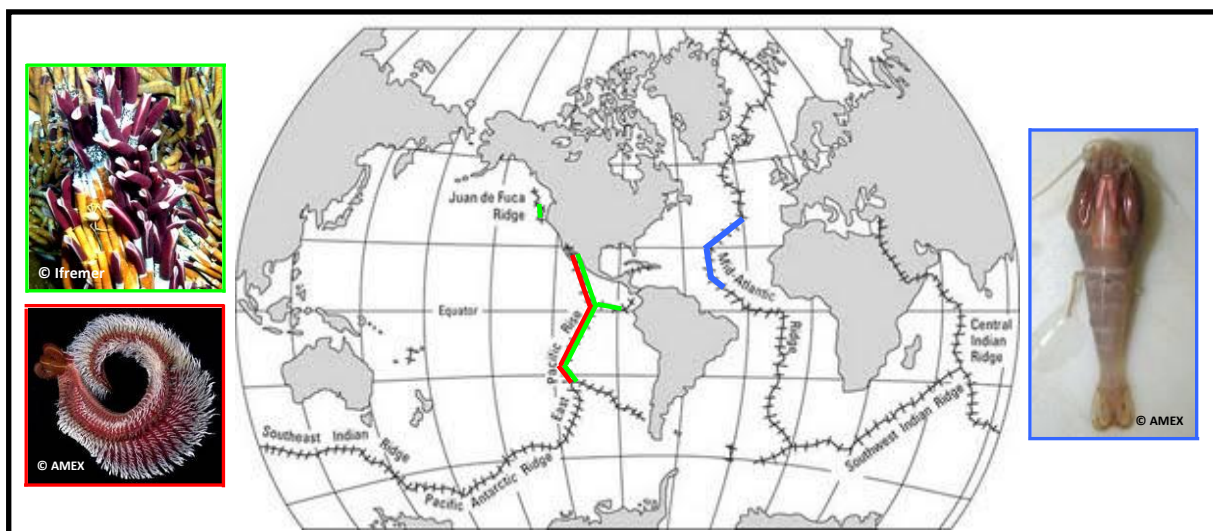


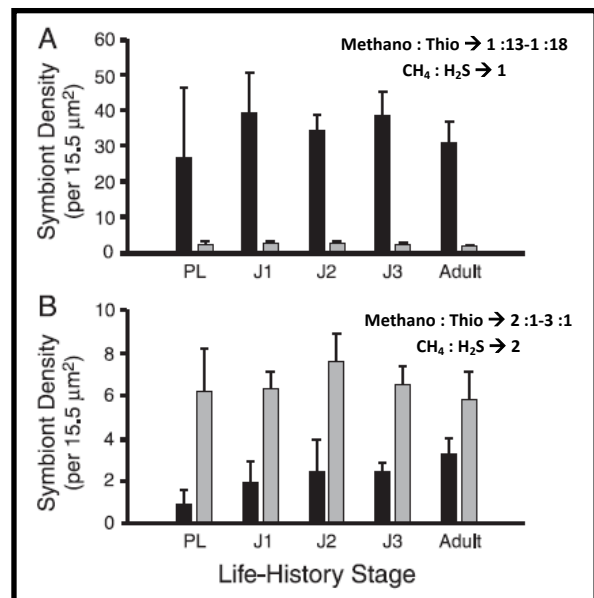
Fig.14 - Répartition de quelques espèces modèles endémiques des écosystèmes hydrothermaux : *R. pachyptila* en vert, *A. pompejana* en rouge et *R. exoculata* en bleu.

Rôle et occurrence des symbioses dans les écosystèmes hydrothermaux - Dans les écosystèmes hydrothermaux, sans lumière, la chimiosynthèse microbienne est la source primaire d'énergie biologique et de matière organique. Les communautés microbiennes présentent une diversité métabolique complexe, jouant ainsi un rôle primordial dans l'installation et le développement de la vie autour des édifices hydrothermaux. Les micro-organismes sont impliqués dans de nombreuses étapes clé des cycles biogéochimiques telles que l'oxydation du méthane et des sulfures. Les micro-organismes sont retrouvés sous forme libre ou en interaction avec des métazoaires. En effet, les conditions de vie dans ce type d'environnement sont éloignées des optima de croissance classiquement admis pour le règne animal. Les interactions durables entre les invertébrés et les micro-organismes γ sont donc courantes. L'association avec des producteurs primaires chimiosynthétiques permet à l'hôte de maximiser son rendement énergétique en compensant les manques ou les faibles teneurs en composés nutritifs présent et utilisables par l'hôte dans l'environnement. Les symbioses au sens large en environnement hydrothermal ont été identifiées dans tous les taxons d'invertébrés inféodés à ces écosystèmes : mollusques gastéropodes (par exemple *Crysmallon squamiferum*) et bivalves (par exemple *Bathymodiolus* spp. et *Calyptogena* spp.), crustacés décapodes anomoures (par exemple *Kiwa hirsuta*) et caridés (par exemple *R. exoculata*), annélides polychaetes (par exemple *Alvinella* spp.) et vestimentifères (par exemple *R. pachyptila*). Les symbioses peuvent être intracellulaires, souvent à bactériocytes localisés dans les branchies de l'hôte ou plus rarement dans un organe spécialisé comme chez *R. pachyptila*. Mais elles peuvent aussi être extracellulaires. Il s'agit alors d'épibioses, observables selon deux types d'organisation. Les épibiontes sont localisés sur la surface tégumentaire de la carapace ou des appendices buccaux de l'individu comme c'est le cas sur le tégument dorsal d'*A. pompejana* ainsi que dans la cavité céphalothoracique et les pièces buccales hypertrophiées de *R. exoculata*. Ou bien les épibiontes sont localisés dans le tractus digestif de l'hôte (hépatopancréas, intestin), ce qui est également le cas de *R. exoculata* qui présente ainsi une double symbiose.

Il est fréquent d'observer une symbiose avec des communautés microbiennes complexes. La diversité des métabolismes au sein de cette communauté fait que les micro-organismes sont adaptés aux variations des conditions géochimiques de l'environnement et ainsi optimisent les interactions avec leur hôte. Les hôtes ont donc de plus amples possibilités d'étendre leur aire de répartition puisqu'ils seraient de fait moins sensibles aux conditions géochimiques différentes. Par exemple, les modioles *Bathymodiolus azoricus* des sites de la ride médio-Atlantique vivent en symbiose avec des bactéries confinées dans des bactériocytes au sein des tissus branchiaux. Ces bactériocytes présentent deux types de symbiontes affiliés aux γ -*proteobacteria* : des sulfo-oxydants (ou thiotrophes) et des méthanotrophes (qui oxydent le méthane et composés méthylés). Deux études s'intéressant à la proportion des deux symbiontes dans les bactériocytes ont montré que cela

dépendait de l'environnement géochimique et non de l'hôte. Salerno et al. (2005) ont comparé des spécimens de *B. azoricus* provenant du site hydrothermal Lucky Strike à des spécimens de *B. heckeræ* provenant d'un site de suintements froids de Blake Ridge (marges continentales atlantiques à l'est de la Floride, 32°31'N-76°12'W, -2170 m) à différents stades de développement. Leurs résultats sur l'abondance relative des deux symbiontes (évaluée par des observations en microscopie électronique à transmission) sont les suivants : les deux morphotypes sont observés dans les branchies de tous les spécimens et dans les mêmes proportions relatives quel que soit le stade de développement de l'hôte. Les symbiontes thiotrophes sont dominants (13 :1-18 :1) dans les *B. azoricus* du site hydrothermal et les méthanotrophes sont dominants (2 :1-3 :1) dans les *B. heckeræ* des suintements froids (**Fig.15**). Ils proposent donc que le ratio CH₄ :H₂S (moins de 1 sur Lucky Strike et supérieur à 2 sur Blake Ridge) soit un facteur déterminant de l'abondance relative des deux symbiontes.

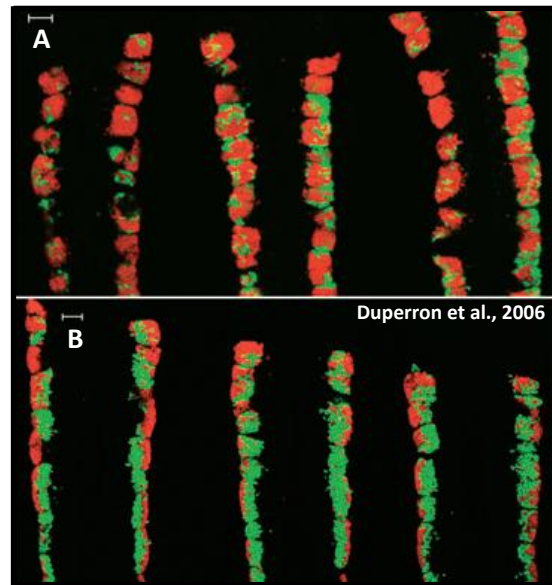
Fig.15 - Densité des symbiontes par 15.5 µm² (± SD) de tissus branchiaux chez *B. azoricus* issu du site hydrothermal Lucky Strike (A) et chez *B. heckeræ* issus des suintements froids de Blake Ridge (B). PL = stade post-larvaire (0.12-0.60 mm); J1-J3 = classes de tailles de juvéniles 1-3 (respectivement 0.6-1.2 mm, 1.2-2.4 mm et 3.6-4.8 mm). Les barres noires correspondent aux morphotypes thiotrophes, les barres grises aux morphotypes méthanotrophes. Les ratios méthanotrophes : thiotrophes et CH₄ :H₂S sont indiqués en haut à droite des graphes (Salerno et al., 2005).



Les hypothèses de Salerno et al. (2005) ont été confirmées par deux séries de travaux : une étude comparant des spécimens de *B. azoricus* provenant de différents sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique (Duperron et al., 2006) et une étude quantifiant les symbiontes de spécimens de *B. azoricus* provenant des sites Menez Gwenn et Lucky Strike soumis à différentes conditions chimiques en aquarium (Halary et al., 2008). Les premiers travaux ont montré que la localisation dans les bactériocytes et la proportion relative de chacun des symbiontes variaient en fonction du site. Par exemple, les fluides purs du site Rainbow (mantellique) contiennent 1.2 mM de sulfure d'hydrogène et 2.5 mM de méthane tandis que ceux du site Lucky Strike (« classique ») contiennent 2.5 à 3.0 mM de sulfure d'hydrogène et seulement 0.50 à 0.97 mM de méthane. Des hybridations *in situ* en fluorescence révèlent que les méthanotrophes sont plus abondants que les thiotrophes dans les

branchies des modioles de Rainbow alors que chez les individus de Lucky Strike, les thiotrophes sont plus abondants que les méthanotrophes (Duperron et al., 2006, **Fig.16**).

Fig.16 – Coupes de branchies de modioles de la rive médio-Atlantique observées en microscopie à fluorescence après hybridation *in situ* et montrant la relative abondance des symbiotes thiotrophes (en rouge, sonde BMARt-193) par rapport aux méthanotrophes (en vert, sonde BMARm-845).
(A), *B. azoricus* de Lucky Strike
(B), *B. azoricus* de Rainbow



La maintenance en aquarium de spécimens de *B. azoricus* dans un milieu enrichi en sulfures révèle également une augmentation significative de l'abondance absolue et relative des symbiotes thiotrophes dans les bactériocytes (Halary et al., 2008). L'abondance relative des symbiotes est donc bien dépendante de l'environnement. La communauté symbiotique est capable de s'adapter en fonction des conditions géochimiques. Cela augmente en retour la valence écologique de l'hôte.

La crevette *R. exoculata*, qui fait l'objet de mon étude, est un autre exemple de couple hôte-communauté microbienne complexe. D'importantes mattes bactériennes organisées tapissent les parois internes de la carapace du céphalothorax (branchiostégites) et ses pièces buccales hypertrophiées (scaphognathites et exopodites). Différents travaux ont suggéré que ces épibiontes pouvaient être sulfo-oxydants, méthanotrophes ou ferro-oxydants (Polz et Cavanaugh, 1995, Zbinden et al., 2004 et 2008, Corbari et al., 2008b). Il est possible que les proportions des épibiontes de différents métabolismes varient en fonction des conditions géochimiques de l'environnement. Il est aussi probable que la complexité de la communauté épibionte soit un moyen d'assurer en permanence les échanges hôtes-épibiontes et épibiontes-épibiontes. Compte-tenu de son activité incessante, la crevette change constamment d'environnement géochimique. Il se peut donc que le passage d'une condition à une autre induise une activité différentielle des épibiontes en fonction de leur métabolisme, et donc qu'il y ait toujours une proportion active au sein de la population bactérienne. *R. exoculata* présente une seconde épibiose, au niveau de l'intestin comme nous le verrons plus loin. Les symbioses digestives sont par ailleurs décrites chez de nombreux arthropodes (insectes et crustacés), comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

3 - Le tractus digestif des crustacés

3.1 - Anatomie du tractus digestif des crustacés

Les crustacés font partie des protostomiens. Au cours de l'embryogenèse, après la phase de gastrulation, le blastopore deviendra la bouche. L'anus sera formé après la mise en place des tissus suite au percement d'un pore. Les tissus composant les différentes parties du système digestif n'ont donc pas la même origine embryonnaire : le stomodeum et le proctodeum sont d'origine ectodermique tandis que le mésentéron est d'origine endodermique. Comme tous les arthropodes, le tractus digestif des crustacés est composé de trois parties (**Fig.17**) : un stomodeum ou intestin antérieur, un mésentéron ou intestin moyen et un proctodeum ou intestin postérieur. Un important hépatopancréas est situé le long du mésentéron.

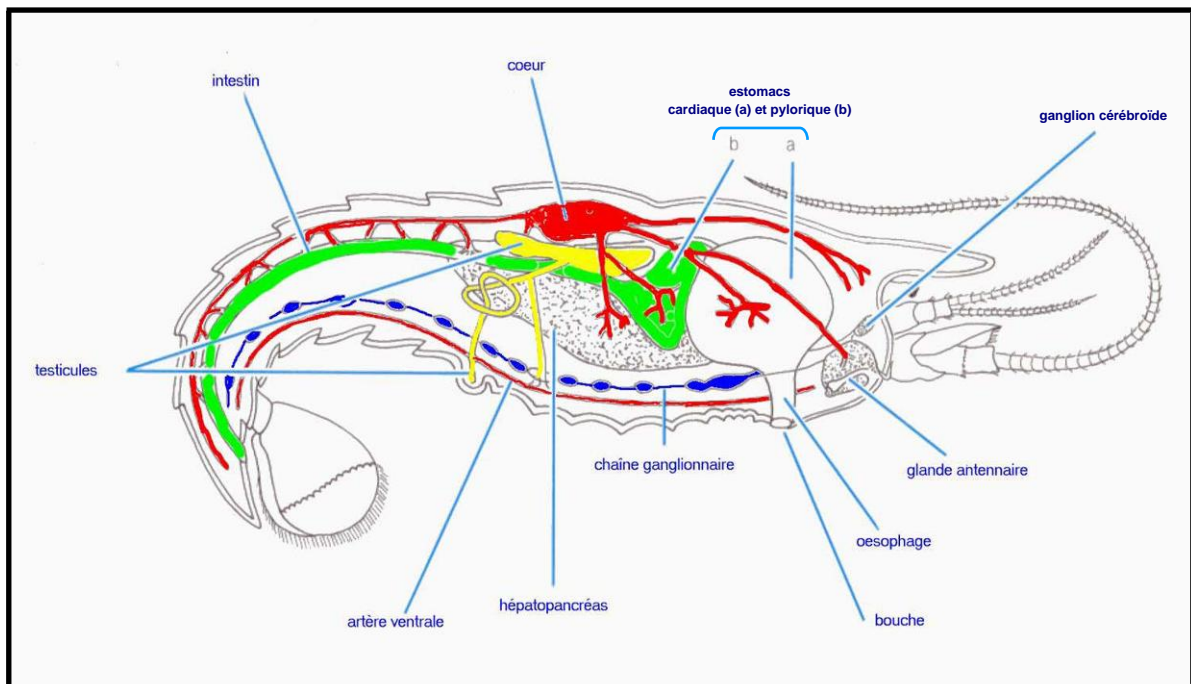


Fig.17 - Schéma de l'anatomie interne générale des crustacés, exemple de l'écrevisse.

Le stomodeum comprend la bouche, un court œsophage et un large estomac. Les décapodes possèdent un estomac complexe subdivisé en deux parties : l'estomac cardiaque et l'estomac pylorique, plus petit. L'estomac est prolongé par le mésentéron et deux caeca. Ils sont situés au début de l'intestin moyen. Le caecum antérieur ou ventral, correspondant à l'hépatopancréas présente de nombreuses figures de mitose et fournit de nouvelles cellules à l'intestin postérieur. A ce jour, la fonction du caecum postérieur ou dorsal n'est pas définie. Le tractus digestif se termine par le proctodeum comprenant le rectum et l'anus. Le stomodeum et le proctodeum sont recouverts d'une cuticule issue de l'invagination du tégument de l'animal. Selon la systématique, une caractéristique

des crustacés est leur exosquelette (tégument ou carapace) composé d'une cuticule chitinoprotéique calcifiée en partie. Son existence a pour conséquence une croissance discontinue, qui a lieu à chaque mue. Le principe de l'exuviation (ou mue) correspond au changement de l'enveloppe tégumentaire, devenue trop petite pour l'animal, pour une plus grande. L'exuvie éliminée lors de la mue correspond donc à l'ensemble de l'exosquelette du crustacé : la cuticule externe et la cuticule interne. La cuticule recouvrant le stomodeum et le proctodeum est donc perdue lors de chaque mue.

Le cas de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* est particulier. Proportionnellement à la taille de la crevette, son estomac est de taille relativement réduite (Segonzac et al., 1993). L'estomac cardiaque présente des structures calcifiées moins développées et moins nombreuses que chez *Mirocaris fortunata* ou *Chorocaris chacei* par exemple, deux autres crevettes hydrothermales (observations personnelles). En revanche, les sillons de soies filtrantes de l'estomac pylorique sont particulièrement nombreuses. Chez les crustacés, le mésentéron représente généralement entre un sixième et un tiers de la longueur totale du tractus digestif (Milne-Edwards, 1840). Toutefois, selon Vogt (1996) qui a réalisé une étude comparative des tractus digestifs de quatre crustacés décapodes : les crevettes *Penaeus monodon*, *Palaemon elegans* et *Troglocaris schmidtii* et l'écrevisse *Astacus astacus*, le mésentéron de l'écrevisse serait court mais plus long que chez les pénaéïdes. Chez *R. exoculata*, crevette caridée, il représente deux-tiers de la longueur totale (**Fig.18**).

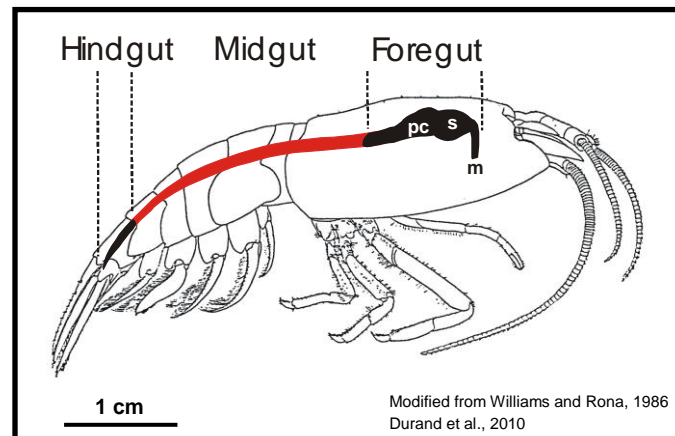


Fig.18 - Schéma de l'anatomie du tractus digestif de *R. exoculata* montrant le stomodeum (foregut, avec m = mouth, s = estomac cardiaque, pc = estomac pylorique), le mésentéron en rouge (midgut) et le proctodeum (hindgut).

3.2 - Organisation fonctionnelle du tractus digestif des crustacés

[Ingestion et direction des particules alimentaires](#) - Le rôle du système digestif est de transformer les aliments en nutriments et de détoxifier l'organisme des déchets ainsi produits. Pour se faire, les différents organes ou parties du tractus digestif ont des fonctions définies. La bouche et

l'œsophage ont uniquement un rôle de transport des aliments vers l'estomac. Les particules ingérées sont lubrifiées à l'entrée de l'œsophage par un mucus riche en polysaccharides, sécrété par les glandes situées sous le tégument. A la différence de l'appareil digestif des vertébrés, l'estomac des crustacés possède un système de filtration très sophistiqué avec un mouvement des fluides bi-directionnel entre l'estomac et l'hépatopancréas et il ne contient pas de pepsine ou de fluides à pH fortement acide (Vogt, 1996). L'estomac cardiaque est en fait un moulin gastrique contenant des pièces articulées calcifiées (3 dents, une dorsale et deux latérales, convergeant vers le centre) actionnées par les muscles de la paroi de l'estomac (Icely et Nott, 1992). Il a une action mécanique de broyage des particules alimentaires ingérées. Il a aussi une action chimique sur celles-ci grâce aux fluides digestifs contenant une variété de protéases, lipases, carbohydrases ou émulsifiants. L'estomac pylorique complète le broyage grâce à des sclérites calcifiées. Mais il sert surtout de chambre de tri grâce aux sillons de soies disposés le long des parois stomacales qui vont orienter les particules alimentaires en fonction de leur taille. Les particules de taille supérieure à 50-100 nm (Vogt, 1996) seront transférées vers l'intestin moyen pour la défécation et les plus grosses seront retenues dans l'estomac cardiaque pour y subir un traitement supplémentaire. Quant au filtrat, il est transporté dans les diverticules hépatopancréatiques pour l'absorption des nutriments. Chez de nombreux crustacés, une membrane péritrophique est sécrétée à la sortie du pylore. Tous les crustacés caridés, dont fait partie *R. exoculata*, possèdent une membrane péritrophique (Forster, 1953). C'est un maillage chitino-protéique entourant le bol alimentaire. Cette membrane représente une barrière naturelle entre le contenu digestif et l'épithélium intestinal, le protégeant ainsi de l'abrasion due aux particules du bol alimentaire et limitant la colonisation microbienne du tube digestif. Elle permet aussi de faciliter le transit du bol alimentaire le long du tractus digestif.

Digestion et absorption des molécules alimentaires - Chez les crustacés, la digestion est extracellulaire et intracellulaire. Ces processus chimiques ont surtout lieu dans le mésentéron et dans les diverticules hépatopancréatiques. Le mésentéron et l'hépatopancréas sont les seules zones du tractus digestif dépourvues de cuticule. Ce sont donc les seules régions qui ne seront pas « éliminées » avec l'exuvie. Elles seront conservées tout au long de la vie de l'individu. Elles représentent alors une zone de colonisation favorable dans le cas d'interactions durables avec un microbiote spécifique.

L'épithélium du mésentéron est généralement constitué d'un seul type cellulaire (Icely et Nott, 1992), des cellules à bordure en brosse, dont les fonctions principales seraient la sécrétion de la membrane péritrophique, l'absorption d'eau lors de la mue et l'absorption de nutriments. L'hépatopancréas, qui se divise en de nombreux tubules (ou diverticules) et communique

directement avec l'estomac pylorique (**Fig.19**), est quant à lui constitué d'un épithélium présentant différents types cellulaires.

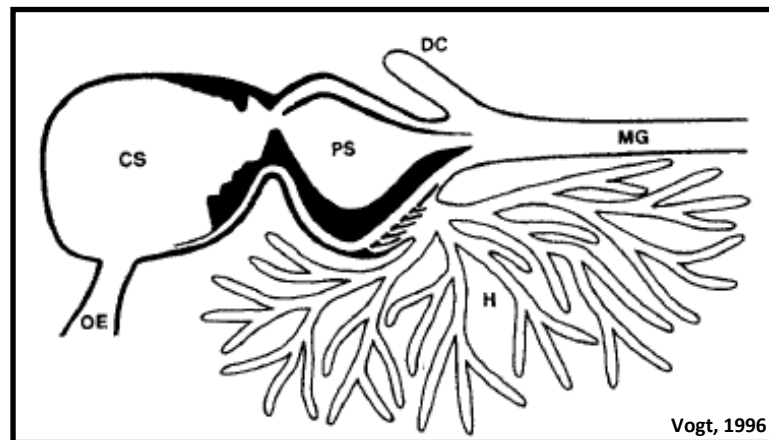


Fig.19 - Représentation schématique du tractus digestif antérieur des crustacés décapodes. OE = œsophage, CS = estomac cardiaque, PS = estomac pylorique, H = hépatopancréas, DC = caecum dorsal, MG = mésentéron.

Chaque tubule est constitué d'une simple couche de cellules épithéliales reposant sur une épaisse lame basale entourée d'un réseau musculaire. L'épithélium est composé de quatre types cellulaires : des cellules embryonnaires E à l'extrémité des tubules et des cellules matures R, F et B le long des tubules présentant des microvillosités à l'apex, où elles sont en contact avec la lumière des tubules alors que leur pôle basal est en contact avec l'haémolymphe (Vogt, 1994). Les cellules R (ou cellules absorbantes, « resorptive cells ») assurent l'équivalent des fonctions intestinales et hépatiques des vertébrés. Elles sont responsables de l'absorption et du catabolisme des nutriments (petites molécules solubles, de la libération de métabolites vers les autres organes, du stockage des réserves nutritives lors des périodes de mue, de reproduction et de jeûne sous forme de lipides et de glycogène ainsi que de la détoxification, notamment des métaux lourds (Vogt, 1994). Les cellules F (ou fibrillaires) assurent principalement les fonctions pancréatiques en synthétisant les enzymes digestives (Vogt et al., 1989). Les enzymes sont excrétées directement dans la lumière de l'hépatopancréas et stockées (de façon extracellulaire) sous forme active dans l'estomac cardiaque ce qui est fondamentalement différent du système digestif des vertébrés. Elles sont également impliquées dans la détoxification du fer et du calcium (Vogt et Qunitio, 1994) et des composés organiques xénobiotiques (Vogt, 1987). Enfin la morphologie des cellules B (ou cellules en forme de ballon) suggère une fonction de dégradation. Elles sont caractérisées par un important complexe apical d'endocytose et une très grande vacuole centrale. Elles absorbent par endocytose les particules et les grosses molécules présentes dans la lumière des tubules ainsi que les enzymes digestives en surplus et elles réalisent la digestion intracellulaire dans leur vacuole (Vogt, 1994). Elles y accumulent les restes non assimilés et sont finalement éjectées dans la lumière par sécrétion

holocrine (toute la cellule se détache de la lame basale). Les trois types de cellules matures sont indépendamment originaires des cellules embryonnaires E. L'ultrastructure des trois types de cellules matures montre que seules les cellules R sont susceptibles d'absorber des nutriments pour les stocker et les redistribuer aux autres organes (Vogt, 1994). Un type cellulaire moins abondant est observé dans tous les diverticules hépatopancréatiques, les cellules M (ou cellules du mésentéron). Elles sont toujours observées isolées et en contact avec la lame basale mais pas avec la lumière. Elles sont interprétées comme des cellules endocrines qui réguleraient l'activité des cellules épithéliales ou du réseau musculaire autour des tubules (Vogt, 1994).

Le transit du bol alimentaire se termine dans l'intestin postérieur dans lequel persiste probablement un transport ionique malgré la présence d'une cuticule recouvrant l'épithélium (Icely et Nott, 1992). Il existe deux voies d'élimination des déchets chez les crustacés : les fèces qui sont constitués des déchets solides, sont éliminées par l'anus alors que les déchets azotés (ammoniaque) et ioniques (riches en urée) sont éliminés par les branchies et les glandes antennaires.

3.3 - Occurrence des symbioses du tractus digestif chez les crustacés marins

[Colonisation microbienne du tractus digestif des crustacés marins](#) - La colonisation microbienne du tractus digestif est décrite dans de nombreux groupes d'arthropodes dont les insectes et les crustacés sont les classes les plus étudiées. En se focalisant sur les crustacés marins, il s'avère que la colonisation microbienne du tractus digestif est observée chez de nombreuses espèces. Les groupes microbiens impliqués sont peu nombreux par rapport à la diversité environnementale et les genres les plus communément isolés de tractus digestifs d'invertébrés aquatiques sont majoritairement *Vibrio* et *Pseudomonas*, mais aussi *Flavobacterium*, *Micrococcus* et *Aeromonas* (Harris, 1993 ; **Tab.3**). Cependant dans certains cas, selon les espèces mais parfois au sein d'une même espèce, des individus arrivent à maintenir leur système digestif relativement exempté de tout micro-organisme ce qui suggère que ceux-ci sont ingérés. Ils forment une population transitoire ou opportuniste, ou ce sont des colonisateurs commensaux (Atlas et al., 1982).

Tab.3 - Genres microbiens trouvés dans les tubes digestifs de crustacés marins (d'après Harris, 1993).

Crustacés	Genres microbiens																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
Amphipodes																								
<i>Boeckosimus affinis</i>	+																		+	+				
amphipod sp.		+																						
Macroures																								
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	+	+		+																				
<i>Penaeus</i> spp. (Dempsey et al., 1989)	+	+	+	+		+									+	+	+			+	+			
<i>Penaeus</i> spp. (Williams et Rees, 1952)				+		+						+										+	+	
<i>Penaeus aztecus</i>	+	+	+	+		+									+	+	+			+	+			
<i>P. setiferus</i>												+												
<i>P. japonicus</i>	+	+	+	+				+																
<i>Upogebia africana</i>	+	+	+												+	+			+					
<i>Callinassa kraussi</i>	+	+	+												+	+			+					
<i>Paranephrops zealandicus</i>					+			+																
<i>Panulirus japonicus</i>	+	+						+		+														
<i>Palaemon paucidens</i>	+	+		+							+				+					+				
<i>Pleoticus robustus</i>	+																							
<i>Plesionica</i> sp.	+																							
<i>Munida</i> sp.	+																							
Brachyours																								
<i>Nematocarcinus</i> sp.	+																							
<i>Atergatis floridus</i>	+	+			+			+																
<i>Schizophrys aspera</i>	+	+	+		+										+									
<i>Tiarinia cornigera</i>	+	+			+			+																
<i>Pachygrapsus crassipes</i>	+	+	+		+			+																
<i>Thalamita prygmina</i>	+	+	+		+			+																
<i>Plagusia dentipes</i>	+	+			+			+																
<i>Callinectes sapidus</i>	+																							
Copépodes																								
<i>Acartia tonsa</i>	+																							
Divers (6 espèces)	+																							

1 <i>Vibrio</i>	6 <i>Photobacterium</i>	11 <i>Moraxella</i>	16 <i>Alcaligenes</i>	21 <i>Xanthomonas</i>
2 <i>Pseudomonas</i>	7 <i>Citrobacter</i>	12 <i>Bacillus</i>	17 <i>Chromobacterium</i>	22 <i>Bacterium</i>
3 <i>Flavobacterium</i>	8 <i>Staphylococcus</i>	13 <i>Cristospira</i>	18 <i>Acinetobacter</i>	23 <i>Achromobacter</i>
4 <i>Aeromonas</i>	9 <i>Cellulomonas</i>	14 <i>Enterobacterium</i>	19 <i>Oceanospirillum</i>	
5 <i>Micrococcus</i>	10 <i>Corynebacterium</i>	15 <i>Cytophaga</i>	20 <i>Alteromonas</i>	

[Le tractus digestif des crustacés marins et les communautés microbiennes associées](#) - Les crustacés entretiennent différents types d'association avec les micro-organismes associés à leur système digestif (**Fig.20**). Les micro-organismes ingérés (1) peuvent être lysés et leurs produits de digestion absorbés (2). Ils servent alors de source nutritive. Mais ils peuvent aussi être lysés et servir de source enzymatique complémentaire pour le consommateur (3). Il s'agit alors d'une association qui ne serait bénéfique que pour l'hôte qui serait à la fois prédateur et parasite. Les organismes ingérés peuvent aussi survivre ou ne pas être digérés. C'est le cas des pathogènes (4) qui renversent ainsi la balance des bénéfiques en leur faveur. Ils colonisent souvent les parois du tractus digestif. C'est également le cas des micro-organismes faisant partie du microbiote transitoire (5). Ces bactéries peuvent simplement transiter dans le bol alimentaire le long du tractus digestif pour être ensuite

évacuées dans les fèces (6). Elles peuvent aussi proliférer dans certaines régions du tube digestif (incubation, 7) en s'attachant parfois à la paroi du tube digestif (8, allochtones épimuraux). Cette population, ainsi que ses produits métaboliques peuvent être utilisés par l'hôte (9) ou être évacués dans les fèces (6). Quant aux micro-organismes résidents (mutualistes ou commensaux) constituant une population stable et pérenne, ils colonisent souvent des zones relativement protégées du tube digestif telles que les replis épithéliaux ou les diverticules (10) ou ils peuvent être fixés à la cuticule de l'intestin postérieur (11, résidents ou autochtones épimuraux). Mais chacune des catégories de population résidente peut être évacuée avec les fèces (6). Ces derniers peuvent être très pauvres (12) ou extrêmement riches en micro-organismes libres (13) selon les capacités de survie des micro-organismes ingérés et la proportion de la population microbienne résidente évacuée dans les fèces.

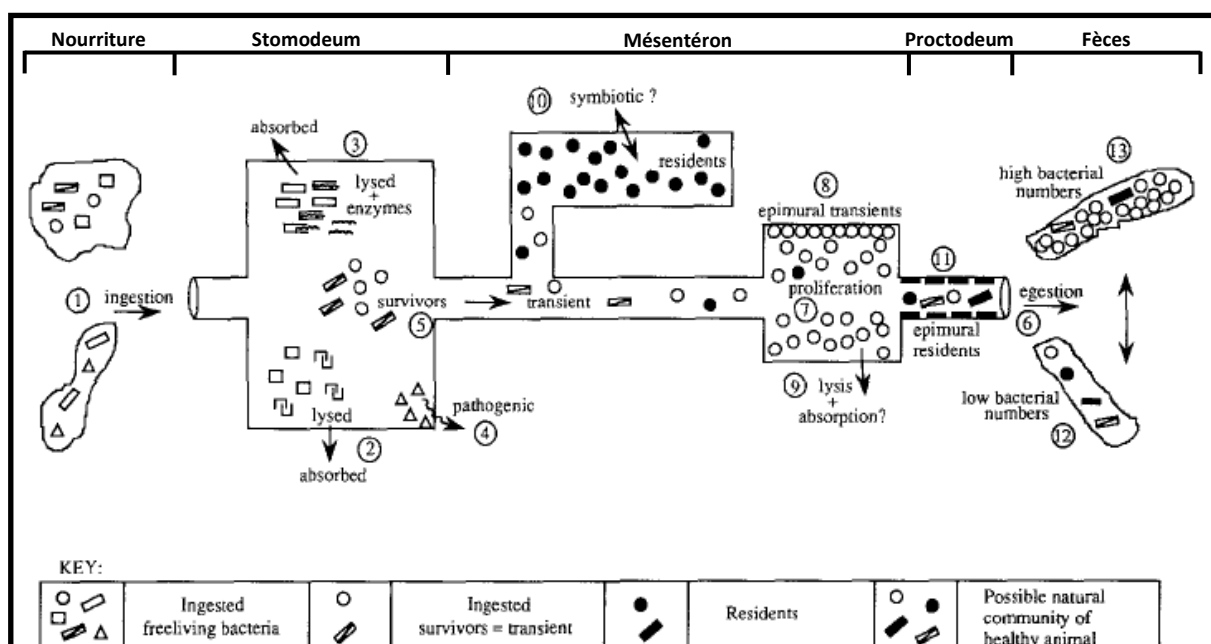


Fig.20 - Schéma illustrant les différents types d'association entre les crustacés marins et les micro-organismes associés à leur système digestif (Harris, 1993).

Les zones d'interactions avec des micro-organismes sont donc localisées tout le long du système digestif des crustacés marins : dans la région orale, c'est-à-dire la bouche (Davis et Sizemore, 1982 ; Huq et al., 1983), l'estomac (Davis et Sizemore, 1982 ; Ohwada et al., 1980), l'intestin antérieur (Ohwada et al., 1980; Ueda et al., 1988 ; Vivares et Baleux, 1984), l'intestin moyen (Atlas et al., 1982 ; Dempsey et al., 1989 ; Harris et al., 1991 ; Huq et al., 1986 ; Pitts et Cowley, 1974), l'intestin postérieur (Atlas et al., 1982 ; Dempsey et al., 1989 ; Harris et al., 1991; Hoyoux et al., 2009 ; Huq et al., 1986 ; Mattson, 1988 ; Wagner-Merner, 1979) et l'hépatopancreas (Harris et al., 1991; Musgrove, 1988). Cependant, la zone la plus couramment décrite dans le cadre des colonisations microbiennes du tractus digestif des crustacés est l'intestin postérieur (Atlas et al., 1982 ; Dempsey et al., 1989 ; Gunzl, 1991 ; Harris et al., 1991; Hoyoux et al., 2009 ; Huq et al., 1986 ; Ohwada et al., 1980). Chez

certaines espèces possédant un mésentéron réduit et un intestin postérieur développé, supposé être la principale région de digestion pour ces espèces, il arrive que plusieurs populations diversifiées d'épibiontes se succèdent le long du tractus digestif. Par exemple chez la galathée *Munidopsis andamanica* (chez qui le mésentéron est probablement si réduit qu'il n'a pas été observé), une dense communauté bactérienne épimurale est observée dans la partie antérieure de l'intestin postérieur et sa partie postérieure est colonisée par des champignons filamenteux (Hoyoux et al., 2009). Il est possible que cela soit lié au niveau de dégradation du bol alimentaire au cours de sa progression dans le tractus digestif. Ce phénomène se traduit par la présence d'une population microbienne et/ou fongique riche et variée au niveau du proctodeum. Une faible colonisation microbienne du stomodeum est également observée chez deux autres groupes d'arthropodes : les insectes et les myriapodes. Il est possible que ce soit à cause de la présence d'une cuticule interne dans une zone plus stable que le stomodeum favorisant ainsi l'attachement des micro-organismes.

Rôle du mutualisme digestif chez les crustacés marins - Les interactions mutualistes généralement rapportées entre les crustacés marins et les micro-organismes associés à leur tractus digestif sont souvent de nature trophique ou détoxifiante. Les symbioses trophiques reposent soit sur l'action directe du micro-organisme qui utilise le composé pour son propre métabolisme et fournit ensuite les nutriments nécessaires à l'hôte, soit sur l'action indirecte du micro-organisme sur les composés ingérés par l'hôte via la sécrétion extracellulaire d'enzymes. Dans ce cas, la production enzymatique des symbiontes permet un pré-conditionnement de la nourriture pour l'hôte (Harris, 1993). De nombreux travaux suggèrent que ce type de communauté microbienne permettrait l'hydrolyse des composés réfractaires ingérés (Dempsey et Kitting, 1987 ; Pinn et al., 1999 ; Lau et al., 2002 ; Oxley et al., 2002 ; Hoyoux et al., 2009). Cependant, il n'y a pas vraiment d'étude démontrant clairement une contribution significative de l'activité de ces symbiontes dans la nutrition de l'hôte. Mais il faut noter que dans ces études, les enzymes sont produites en laboratoire depuis des souches isolées à partir de tubes digestifs. Les conditions de culture sont donc sensiblement différentes des conditions *in situ* où plusieurs communautés microbiennes interagissent. De plus, seuls les souches microbiennes viables et cultivables peuvent être étudiées de la sorte. Ainsi, certaines enzymes peuvent être produites en culture mais pas *in situ* et inversement. Une grande proportion des crustacés marins étudiés possèdent des symbiontes synthétisant des protéases, des lipases et des chitinases mais peu d'espèces ont des symbiontes capables de digérer la cellulose contenue dans le bois (Harris, 1993 ; **Tab.4**).

Tab.4 - Principales activités enzymatiques d'origine microbienne détectées dans les tubes digestifs de crustacés marins (d'après Harris, 1993).

Crustacés	Enzymes										+ = présent - = absent ? = expérience non concluante blanc = non testé
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Amphipodes											
<i>Boecksimus affinis</i>							+	+	+		
Macroures											
<i>Paranephrops zealandicus</i>			+	+					+		
<i>Penaeus aztecus</i>	+		+				+	+	+		1 Amylase
<i>P. setiferus</i>	+						+	+	+		2 Endoglucanase
<i>Upogebia africana</i>	+	+			-	+	+	+	+	+	3 Cellulase
<i>Callinassa kraussi</i>	+	-			+	+	+	+	+	+	4 Laminarinase
<i>Mysis stenolopsis</i>				?							5 Alginase
Copépodes											6 Agarase
<i>Acartia tonsa</i>							+	+	+		7 Chitinase
											8 Protease
											9 Lipase
											10 Lysozyme

Même s'il peut y avoir un réel gain nutritif pour l'hôte, ce type de symbiose pose un problème. En effet, les produits de dégradation des composés sont utilisés à la fois par l'hôte et le symbionte. Il y a donc compétition entre les associés. Le microbiote digestif est aussi connu pour renforcer la résistance de l'hôte aux effets de divers composés toxiques. Par exemple, les symbiontes digestifs de la crevette *Penaeus aztecus* sont résistants aux phénols et pourraient aider à la digestion de l'halophyte *Thalassia* sp. dont les tissus en sont riches (Dempsey et Kitting, 1987). Les bactéries résistantes à la créosote associées au tube digestif de l'isopode *Limnoria tripunctata* jouent apparemment un rôle important dans la nutrition de leur hôte ainsi que dans la colonisation du substrat quand ce dernier vit sur du bois traité à la créosote (Zacchary et al., 1983). Le système digestif des crustacés marins représente donc un réservoir non négligeable de micro-organismes ainsi qu'une source potentielle de molécules exploitables dans les biotechnologies. Mais l'acquisition de cette communauté microbienne entre les mues reste mal documentée, de même que leur transmission à chaque génération.

3.4 - Méthodes d'étude des symbioses

L'étude des symbioses peut souvent se révéler fastidieuse. Pour appréhender l'intimité de la relation entre les partenaires, il faut d'abord comprendre la biologie de chacun des associés. Certaines méthodes comme les techniques de culture microbiennes pour les symbiontes, permettent d'étudier séparément les protagonistes lorsqu'il est possible de les dissocier et qu'ils sont viables en dehors de l'association. Mais il n'est pas toujours possible de dissocier les partenaires. C'est pourquoi il existe d'autres alternatives afin d'étudier le couple dans son ensemble, comme les techniques de microscopie, ou de les séparer virtuellement grâce à des techniques moléculaires ou biochimiques.

Enfin, l'approche *in vivo* est la plus ancienne méthode d'étude des modèles biologiques. Elle peut être utilisée pour l'étude globale de l'association symbiotique afin de mettre en évidence les relations complexes entre les protagonistes telles qu'un transfert de matière par exemple.

Techniques de culture – C'est la première méthode mise au point pour l'étude des micro-organismes. Les techniques principales sont la culture en substrat liquide (en tubes, fioles, fermenteur) et la culture sur substrat solide (substrat gélosé). Cependant, 99 % des micro-organismes sont difficiles voire impossibles à cultiver (Moran, 2006). Ceci est directement lié à la méthode qui est, par définition, plus sélective que les conditions de vie en milieu naturel. Les besoins des micro-organismes ne sont pas toujours connus ce qui impose un choix de conditions : quels substrats nutritifs et énergétiques, quelle température, quel pH ? Mais aussi et surtout, la culture classique nécessite une forme de vie libre. Or, en conditions *in situ*, les micro-organismes vivent en communauté, formant parfois des biofilms, des agrégats, voire des associations avec d'autres espèces microbiennes. Aujourd'hui, les méthodes de culture en continu (en fermenteur) sont de plus en plus développées dans l'approche culturale (Postec et al., 2007 ; Byrne et al., 2009). Le but est de cultiver non plus une population simple de micro-organismes mais des communautés complexes, favorisant ainsi le maintien des interactions au sein de ces communautés microbiennes. Lorsque les micro-organismes sont associés à des hôtes, comme pour les symbioses, ceci implique une dépendance des espèces d'intérêt par rapport à d'autres. C'est donc pour cela que l'étude des symbioses par les seules techniques de culture n'est pas aisée car l'apport de l'hôte pour ses symbiotes reste le plus souvent totalement inconnu. De nombreuses alternatives existent et ont été développées dans un but de complémentarité avec l'approche culturale. Ces techniques sont la microscopie et la biologie moléculaire. L'étude des symbioses nécessite également un grand investissement dans l'expérimentation *in situ*.

Techniques de microscopie – La microscopie est l'approche la plus utilisée dans l'étude des symbioses. Différentes techniques de microscopie existent, chacune ayant une résolution différente (**Fig.21**). Mais dans la majorité des cas, les symbiotes sont situés dans des zones difficiles à observer. C'est le cas des symbioses digestives qui se situent à l'intérieur du corps l'hôte, dans son système digestif, voire à l'intérieur de certaines cellules de l'hôte. En général, la dissection minutieuse de l'hôte pour obtenir les pièces d'intérêt est nécessaire. Celles-ci peuvent alors rarement être observées directement en microscopie en raison de leur taille ou de leur épaisseur.

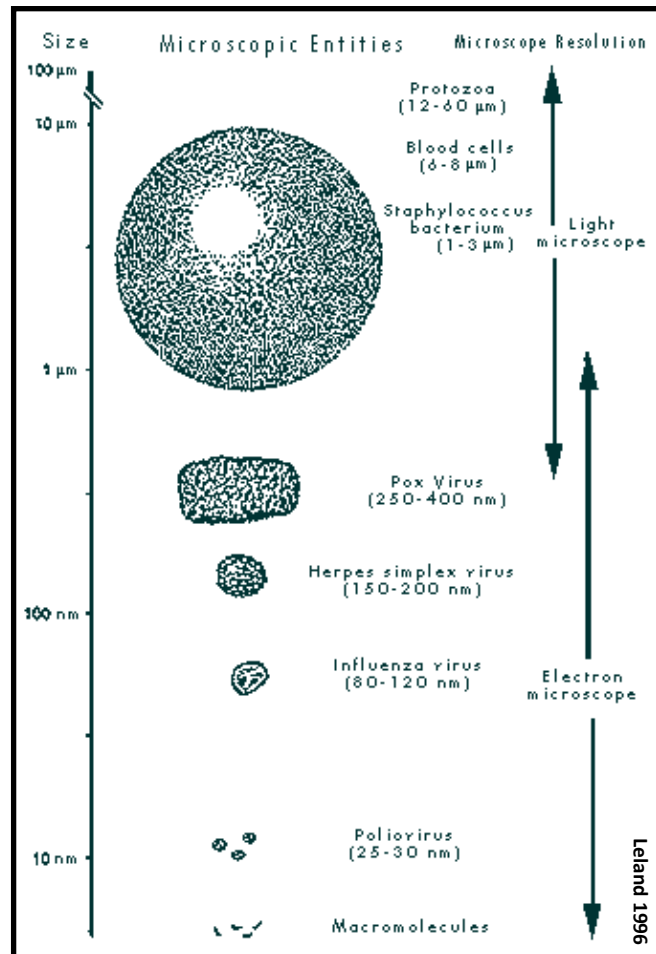


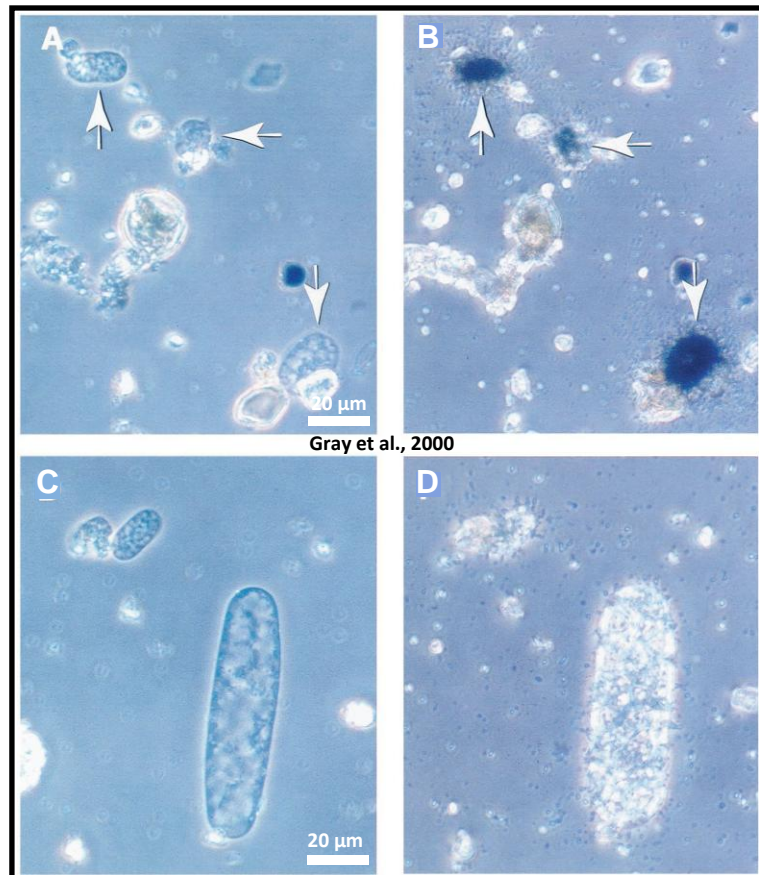
Fig.21 – Représentation schématique des entités microscopiques (eucaryotes unicellulaires, micro-organismes, virus, macromolécules) et de la résolution des techniques de microscopie (microscopie optique et électronique).

Lorsque la taille des pièces anatomiques à étudier est trop importante, celles-ci sont souvent incluses dans un bloc de résine qui permettra de couper l'organe (ou l'individu entier s'il est petit) en sections fines ou ultrafines sériées (Duperron et al., 2007). Ainsi, la répartition des symbiotes est ainsi observable le long de l'organe (ou dans l'individu). Des sections d'échantillons inclus en milieu d'enrobage (résine, paraffine, polyéthylène glycol) sont aussi bien utilisées en microscopie optique, en microscopie électronique à transmission ou en microscopie à épifluorescence ou encore en microscopie à balayage laser confocal pour visualiser, localiser, identifier (hybridations *in situ*) et quantifier les symbiotes. Avec les techniques actuelles, une reconstruction en trois dimensions de l'organe (ou individu) et de la disposition des symbiotes dans celui-ci est possible.

La microscopie photonique est une technique classique en histologie. Les différents tissus sont visibles et peuvent être discriminés grâce à différentes colorations. Il existe aussi l'approche par micro-autoradiographie qui permet de mettre en évidence une activité cellulaire en utilisant une molécule intervenant spécifiquement dans cette activité. Les organismes ou cellules sont mis en contact avec des molécules marquées avec un isotope radioactif. Après préparation pour la

microscopie, il faut superposer l'image de microscopie photonique avec la même obtenue sur un film autoradiographique pour localiser l'activité cellulaire (**Fig.22**, Gray et al., 2000).

Fig.22 – Micro-autoradiographie de cellules d'*Achromatium* (*Gammaproteobacteria*) provenant de sédiments de Rydal Water enrichis en ^{14}C -bicarbonate. Les clichés du même champ visuel sont pris en contraste de phase (A, C) et en micro-autoradiographie (B, D). L'assimilation du composé marqué est positive en B (flèches blanches), elle est négative en D et ne montre que du bruit de fond.



La micro-autoradiographie peut également être associée à la microscopie électronique à transmission pour une meilleure résolution ou à la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence pour une affiliation phylogénétique des micro-organismes (voir ci-après). La microscopie photonique reste cependant limitée pour l'étude des symbiotes. Sa résolution de 0,2 μm est insuffisante pour une analyse fine des structures microbiennes.

La microscopie électronique à balayage offre une résolution 100 fois supérieure : 2 nm. Elle se réalise sur des échantillons non inclus. Elle permet de visualiser les symbiotes d'un point de vue général afin d'étudier leur morphologie mais aussi les interactions physiques avec l'hôte tels que les points d'ancrage (**Fig.23A**, Zbinden et al, 2004, 2008). Elle permet également de dénombrer les symbiotes lorsqu'ils sont facilement observables, ce qui peut être rendu difficile lorsqu'ils sont dans le bol alimentaire. La microscopie électronique peut également être couplée à de la microanalyse élémentaire aux rayons X, permettant une analyse qualitative et quantitative des éléments chimiques présents dans une zone de l'échantillon. Il existe aussi des microscopes électroniques à balayage dits « environnementaux ». L'observation a lieu à 5°C, sous une humidité relative supérieure ou égale à 50 % et à une pression de 665 Pa (soit 5 Torr alors qu'en microscopie à

balayage classique, le vide est poussé entre 10^{-3} et 10^{-7} Torr) sur des échantillons non fixés, voire des tissus ou des organismes vivants. Ces conditions sembleraient être plus favorables au maintien des structures anatomiques lors de l'observation (Bergmans et al., 2005) et permet de réaliser d'autres analyses sur ce même échantillon, en biologie moléculaire par exemple.

En microscopie électronique à transmission, l'échantillon est traversé par le faisceau d'électron qui rend les structures cellulaires internes (des organites à l'ADN) et la structure de la paroi cellulaire observables (**Fig.23B-C**, Zbinden et al., 2008). L'évolution des appareils permet aujourd'hui d'atteindre une résolution jusqu'à 0,8 Angström sur certains matériaux.

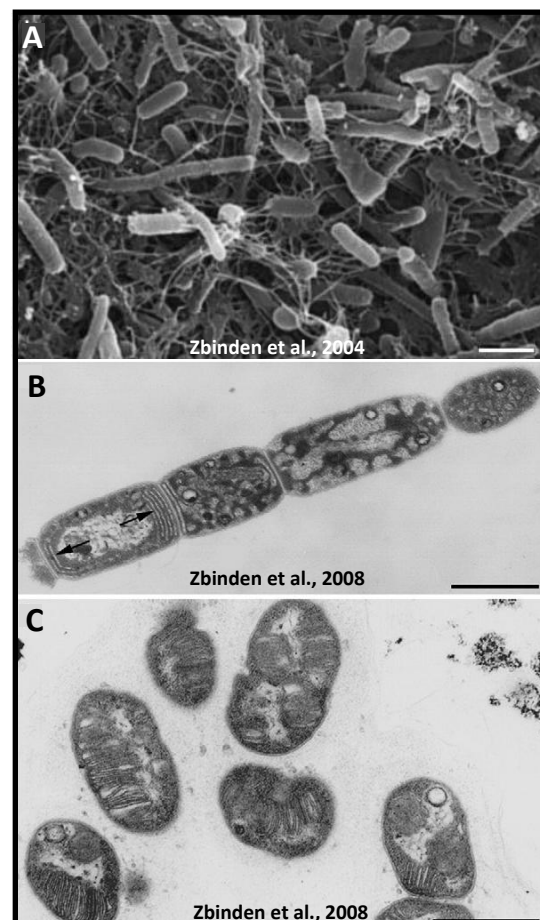


Fig.23 – Epibiontes de la cavité céphalothoracique de *Rimicaris exoculata* vus en microscopie électronique. Observation en microscopie électronique à balayage montrant des bacilles et leur sécrétion de polymère d'attache (A). Observation en microscopie électronique à transmission montrant les structures internes d'une bactérie filamenteuse (B) et les membranes interne de bactéries méthanotrophes (C). Barres d'échelle = 1 μm .

La microscopie à épifluorescence couplée à des hybridations *in situ* (Fluorescent *in situ* hybridization ou FISH), est une technique qui a été développée récemment et qui tient actuellement une place de premier rang dans l'étude des symbioses. L'ARN des symbiontes est hybridé avec une sonde portant un fluorophore, complémentaire d'une séquence nucléotidique (ADN ou ARN) spécifique. Dans le cas d'une hybridation des ARN ribosomiaux, des sous-unités composant les ribosomes, la sonde hybride une séquence permettant d'identifier spécifiquement un domaine du Vivant (par exemple *Archaea*, *Bacteria*, *Eucarya*), un groupe microbien (*Epsilonproteobacteria*, *Thermococcales*...) ou un individu en particulier (par exemple un épibionte du tube digestif d'un hôte donné et affilié à une *Gammaproteobacteria*). C'est donc une technique qui permet non seulement de localiser les

symbiontes mais aussi de les identifier à un niveau phylogénétique plus ou moins fin. De plus, avec les sondes hybridant les ARN ribosomiaux, l'intensité du signal est partiellement liée à l'activité cellulaire. En effet, un signal intense reflète un nombre de ribosomes important et donc une cellule active, et inversement. Cette technique peut aussi se révéler être utile pour des estimations semi-quantitatives de l'abondance des symbiontes. Par exemple, la modiole *B. azoricus* possède deux types de symbiontes phylogénétiquement distincts, des méthanotrophes et des thiotrophes, dans des bactériocytes des tissus branchiaux. Récemment, une équipe a mis au point un programme informatique permettant de quantifier l'abondance relative et absolue des symbiontes thiotrophes selon les conditions chimiques environnementales (Halary et al., 2008). Afin d'amplifier le signal des cellules peu actives, la technique de CARD-FISH (CAlyzed Reporter Deposition) a été mise au point. Dans ce cas, la sonde est marquée par une molécule qui est reconnue par un anticorps sur lequel est fixé un amplificateur de signal (Pernthaler et al., 2002). Enfin, les sondes peuvent aussi cibler des ARN messagers de gènes de fonction permettant alors de « visualiser » la fonction des cellules (Pernthaler et al., 2004).

L'hybridation *in situ* a ensuite été améliorée en couplant à cette technique le marquage isotopique et la spectrométrie de masse à ionisation secondaire à l'échelle nanométrique (FISH/NanoSIMS, **Fig.24**). Le NanoSIMS est un procédé d'analyse de la surface (en deux dimensions) et de volume (en trois dimensions) jusqu'à des profondeurs de quelques microns grâce au bombardement de la surface de l'échantillon avec un faisceau d'ions. La récolte des ions secondaires ainsi créés permet de mesurer la composition chimique élémentaire, isotopique ou moléculaire de l'échantillon. Sa sensibilité (limite de détection ou détection de traces) et sa résolution spatiale (de l'ordre de 50 nm) en font un outil très performant pour l'étude des interactions microbiennes et donc des symbioses (Behrens et al., 2008 ; Dattagupta et al., 2009). Pour des résultats au plus proche des conditions *in situ*, l'hybridation peut être réalisée en EL-FISH (pour Elemental Labelling-Fluorescence *In Situ* Hybridization). Dans ce cas, un marqueur minéral tel que la fluorine ou la bromine est fixé à la sonde. Le signal sera ensuite amplifié suite à la catalyse de cet élément. C'est la technique utilisée par Behrens et al. en 2008 pour démontrer les interactions au sein du consortium microbien constitué par une *Cyanobacteria* et une *Alphaproteobacteria* (**Fig.24**).

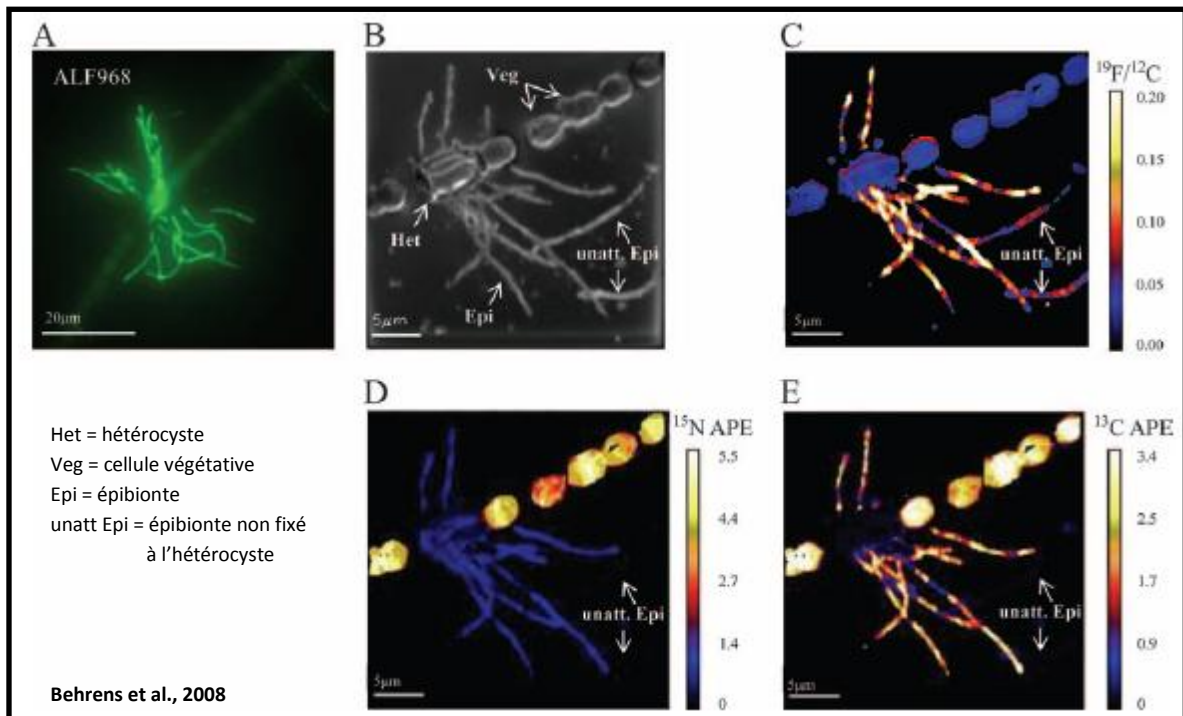


Fig.24 - Consortium microbien constitué d'une *Cyanobacteria* filamenteuse (*Anabaena sp.* SSM-00) et d'une *Alphaproteobacteria* (*Rhizobium sp.* WH2K) fixée à un hétérocyste, observé en fluorescence et NanoSIMS après 24h d'incubation avec du ^{13}C -bicarbonate et du ^{15}N -diazote. (A), consortium hybridé en EL-FISH avec la sonde ALF968 spécifique des *Alphaproteobacteria* observé en épifluorescence ; (B), image en électrons secondaires du consortium en Nano-SIMS correspondant aux panels C à E ; (C), localisation de la fluorine relative au carbone après hybridation en EL-FISH avec la sonde ALF968 ; (D), distribution de l'enrichissement en ^{15}N -diazote ; (E), distribution de l'enrichissement en ^{13}C -bicarbonate. Les barres de couleur indiquent l'abondance relative (C) et l'enrichissement isotopique (D, E) dans l'image.

La microscopie est une des premières techniques utilisées pour l'étude des symbioses. Actuellement, elle est souvent couplée à la biologie moléculaire.

Techniques moléculaires et biochimiques – La biologie moléculaire est aujourd'hui utilisée en routine dans différents domaines des sciences du Vivant. Dans l'étude des symbioses, elle permet une approche globale de l'association hôte-symbionte grâce à l'étude comparée de l'évolution des partenaires par exemple ou de la diversité des symbiontes. Diverses méthodes existent pour étudier cette diversité et avoir accès à la taxinomie des modèles d'étude. L'amplification de gènes (par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR) constitue la base de toutes ces techniques. Lorsqu'une identification phylogénétique précise est nécessaire, le gène amplifié est séquencé et comparé avec les bases de données internationales grâce au logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al., 1990). La compilation et l'analyse des séquences permettent de retracer les liens phylogénétiques entre elles en utilisant différents algorithmes de calcul tels, pour les plus connus, le neighbour-joining (Saitou et Nei, 1987), le maximum de parsimonie (Camin et Sokal, 1965), le

maximum de vraisemblance (Felsenstein, 1981) et Mr Bayes très utilisé pour les études de co-évolution (Ronquist et Huelsenbeck, 2003). Des techniques de ré-échantillonnage, tel que le « bootstrap » (Felsenstein, 1985), permettent de tester la fiabilité de l'analyse.

L'approche moléculaire la plus courante pour l'étude des symbiotes microbiens est l'analyse des gènes codant l'ARN ribosomal 16S (ARNr) ou de la séquence de l'ARNr 16S lui-même. Ce gène est présent chez tous les procaryotes et comporte des régions plus ou moins conservées au cours de l'évolution qui discriminent les organismes les uns par rapport aux autres. L'ARNr 16S est un composant obligatoire de la petite sous-unité des ribosomes. Son expression témoigne donc de l'activité cellulaire. Ainsi, l'étude de l'ADN donne accès à tous les individus vivants ou morts tandis que l'ARN ne donne accès qu'à ce qui est vivant. Une variante consiste à amplifier l'ARN messager (ARNm) de certains gènes de fonction. Comme les ARNm ne sont synthétisés que lorsque la cellule a besoin des protéines correspondantes, cela donne accès aux organismes vivants et actifs ainsi qu'aux fonctions actives *in situ*. Pour connaître la structure des communautés microbiennes, les séquences ribonucléiques obtenues peuvent être analysées directement par séquençage ou par empreinte génétique.

L'empreinte génétique donne un profil qui pourra être utilisé pour classer les individus par catégorie ou pour comparer des conditions différentes en fonction de la présence ou de l'absence des individus. Ces résultats sont en général obtenus par séparation des fragments d'acides nucléiques sur gel suite à leur restriction enzymatique (méthode basée sur le polymorphisme des fragments de restriction) ou à leur dénaturation lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques double brins (méthode basée sur la stabilité des liaisons hydrogène entre les acides nucléiques complémentaires comme par exemple l'électrophorèse sur gradient dénaturant ou DGGE). Il est possible de réaliser une comigration des amplicons correspondant aux séquences d'ADNr 16S et d'ARNr 16S d'une communauté microbienne en gradient dénaturant (Roussel et al., 2009). L'intérêt est d'identifier les micro-organismes vivants actifs au sein d'une communauté totale. Cela est applicable et peut être révélateur dans le cadre des symbioses digestives dont le problème récurrent est la discrimination du microbiote résident et du microbiote allochtone, supposé moins actif que le précédent. Des techniques dont le principe repose sur l'affinité des acides nucléiques à une colonne qui associent parfois à cela les propriétés liées à la dénaturation de ces molécules sont également de plus en plus utilisées. Ce sont la SSCP pour polymorphisme de conformation des acides nucléiques simples brins (« Single-Strand Conformation Polymorphism ») ou la chromatographie haute performance en phase liquide et en condition dénaturante ou DHPLC (« Denaturing High Performance Liquid Chromatography »). Les méthodes dont le principe est d'analyser la diversité d'individus en fonction de leur empreinte génétique ont un intérêt dans l'étude des symbioses car elles se révèlent assez bien résolutive dans le cas d'une diversité réduite.

Le séquençage tient une grande part dans l'étude de la diversité en complétant souvent les autres approches. Cette méthode d'analyse présente des biais dont certains sont liés au principe même de la technique (Bent et Forney, 2008 ; Quince et al., 2008 ; Hong et al., 2009 ; Huber et al., 2009) : le rendement de l'extraction des acides nucléiques dépend de la méthode d'extraction, le fait de choisir un couple d'amorce en PCR biaise les résultats en créant une sélection artificielle des fragments lors de l'amplification, d'autant plus que les ADN des différents groupes phylogénétiques ne s'amplifient pas tous aussi facilement. Pour finir, séquencer une partie des fragments obtenus ne révèle que les organismes dominants. Pour pallier ce problème, le pyroséquençage est développé depuis quelques années. Il s'agit de séquençage à haut débit qui permet alors d'avoir accès à ce qui est très peu représenté en séquençant un nombre de séquences nucléiques très conséquent (Stewart et Cavanaugh, 2009). Cependant, une étude récente indique que la taille des amplicons produits (fragments nucléotidiques amplifiés par polymérisation en chaîne) est un paramètre au moins aussi important que le nombre de séquences réalisées afin d'identifier les espèces rares (Huber et al., 2009).

La métagénomique nécessite aussi de faire appel au séquençage haut débit. Cette approche consiste à étudier collectivement tous les génomes, sans les détailler individu par individu. Elle présente ainsi l'avantage d'une analyse plus complète, et d'un affranchissement des limitations dues au choix de couples d'amorces connus. Cependant il a été montré que cette technique comporte aussi des biais du fait de l'étape de clonage des grands fragments dans différents vecteurs (fosmides ou BAC) qui n'insèrent pas de façon homogène les ADN ayant une composition en G+C très hétérogène (Feingersch et Bèjà, 2009). Mais d'un point de vue écologique, le principe de la technique est plus pertinent puisqu'il donne un aperçu global de l'écosystème étudié : il révèle les espèces présentes mais aussi les gènes de fonctions présents, même ceux jusqu'alors inconnus. La reconstruction du puzzle ainsi obtenu permet alors d'émettre des hypothèses sur le fonctionnement de cet écosystème (Walsh et al., 2009). Dans le cas des symbioses, il est parfois difficile d'isoler les symbiontes, surtout en ce qui concerne des épibiontes digestifs localisés le long de l'épithélium intestinal et non dans une glande ou un organe spécialisé. La métagénomique est donc une façon d'appréhender les individus et fonctions, même inconnues, mis en jeu dans l'association par une approche globale. Ces techniques moléculaires ont été successivement utilisées pour étudier les symbioses digestives chez l'Homme (Rajilic-Stojanovic et al., 2007 ; Verberkmoes et al., 2008).

La protéomique est parfois utilisée dans l'étude des relations symbiotiques. Elle prend souvent son importance lorsqu'il s'agit d'étudier les récepteurs impliqués dans les symbioses par exemple. En analysant la structure de ces protéines (migration sur gel pour déterminer le nombre de sous-unités et leur taille), dans quelles conditions elles sont produites (protéines de stress, début de colonisation par les symbiontes, Sélosse, 2000) et les interactions qu'elles ont avec d'autres protéines

(interactions avec le protéome de l'individu lui-même ou avec un protéome étranger), la compréhension précise du fonctionnement de l'association symbiotique est nettement améliorée. Cette approche permet d'étudier au plus près les liens qui unissent les partenaires de l'association et le fonctionnement des mécanismes de reconnaissance et de transmission des symbiotes.

Approche in vivo – Afin de mieux étudier une relation symbiotique et lorsqu'il est impossible ou difficile d'étudier séparément les partenaires d'une symbiose, il faut mettre en place un protocole afin d'appréhender *in vivo* la relation hôte-symbiote et les mécanismes mis en jeu. Certains modèles tels que *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* et *Mus domesticus* sont cultivés ou élevés en laboratoire et par conséquent plus aisés à étudier. Il est alors possible de caractériser les échanges hôte-symbiotes ou les métabolismes des symbiotes par l'incorporation de composés marqués, d'isotopes stables ou radioactifs. Pour étudier le comportement et les mécanismes lors du processus de colonisation par les symbiotes, les expérimentations les plus fréquentes sont basées sur l'utilisation d'hôtes aposymbiotiques (dépourvus de symbiotes). Les expérimentations *in vivo* sont alors mises en place en fonction des modèles biologiques (voir Moran, 2006 et Brownlie et Johnson, 2009 pour revue). Un premier exemple de méthodologie est l'étude de l'acquisition des symbiotes *Rickettsia* et *Hamiltonella* par les guêpes *Eretmocerus emiratus*, *Eretmocerus eremicus* et *Encarsia pergandiella*, parasitoïdes de la mouche blanche de la pomme de terre *Bemisia tabaci* (Chiel et al., 2009). Le constat de départ est que les larves des guêpes parasitoïdes possédant des symbiotes se nourrissent des mouches infectées par *Rickettsia* ou *Hamiltonella*. L'équipe a donc produit des guêpes aposymbiotiques par administration d'antibiotiques sur plusieurs générations afin de déterminer le mode de transmission des symbiotes *Rickettsia* et *Hamiltonella*. Ils ont démontré que le mode de transmission pouvait dépendre de l'espèce du symbiote et que la transmission horizontale pouvait rencontrer certains obstacles au sein des réseaux trophiques. Un second exemple de méthodologie est l'étude de l'acquisition des symbiotes des bivalves de la famille des *Lucinidae* (Brissac et al., 2009). Dans la littérature, la transmission des symbiotes branchiaux des bivalves *Solemyidae* ou *Vesicomysidae* est démontrée comme étant verticale. Mais chez les *Lucinidae*, elle est décrite comme environnementale. Cela implique une libération des symbiotes par les individus adultes dans l'environnement, qui coloniseront par la suite les juvéniles. L'équipe a incubé des individus adultes seuls ou par deux dans un milieu stérile et a contrôlé régulièrement la présence de symbiotes dans cet environnement. Ils ont ainsi démontré qu'il n'y avait aucune libération de symbiotes durant 30 jours malgré leur pérennité dans les branchies des hôtes. Ils considèrent donc qu'une fois acquis, les symbiotes sont conservés par l'hôte jusqu'à sa mort mais ne sont pas transmis à la génération suivante (pas de transmission verticale). L'acquisition serait donc bien environnementale mais la colonisation serait réalisée par des « nouveaux »

symbiontes au fil des générations. La symbiose des *Lucinidae* ne serait favorable que pour l'hôte et constituerait à terme une fin létale pour les symbiontes.

4 - *Rimicaris exoculata* : sa vie, son oeuvre

4.1 - *Rimicaris exoculata* : « Vos papiers s'il vous plaît ! »

La crevette *Rimicaris exoculata* est un *Arthropoda*, *Crustacea*, *Decapoda*, *Alvinocarididae* (Fig.25).

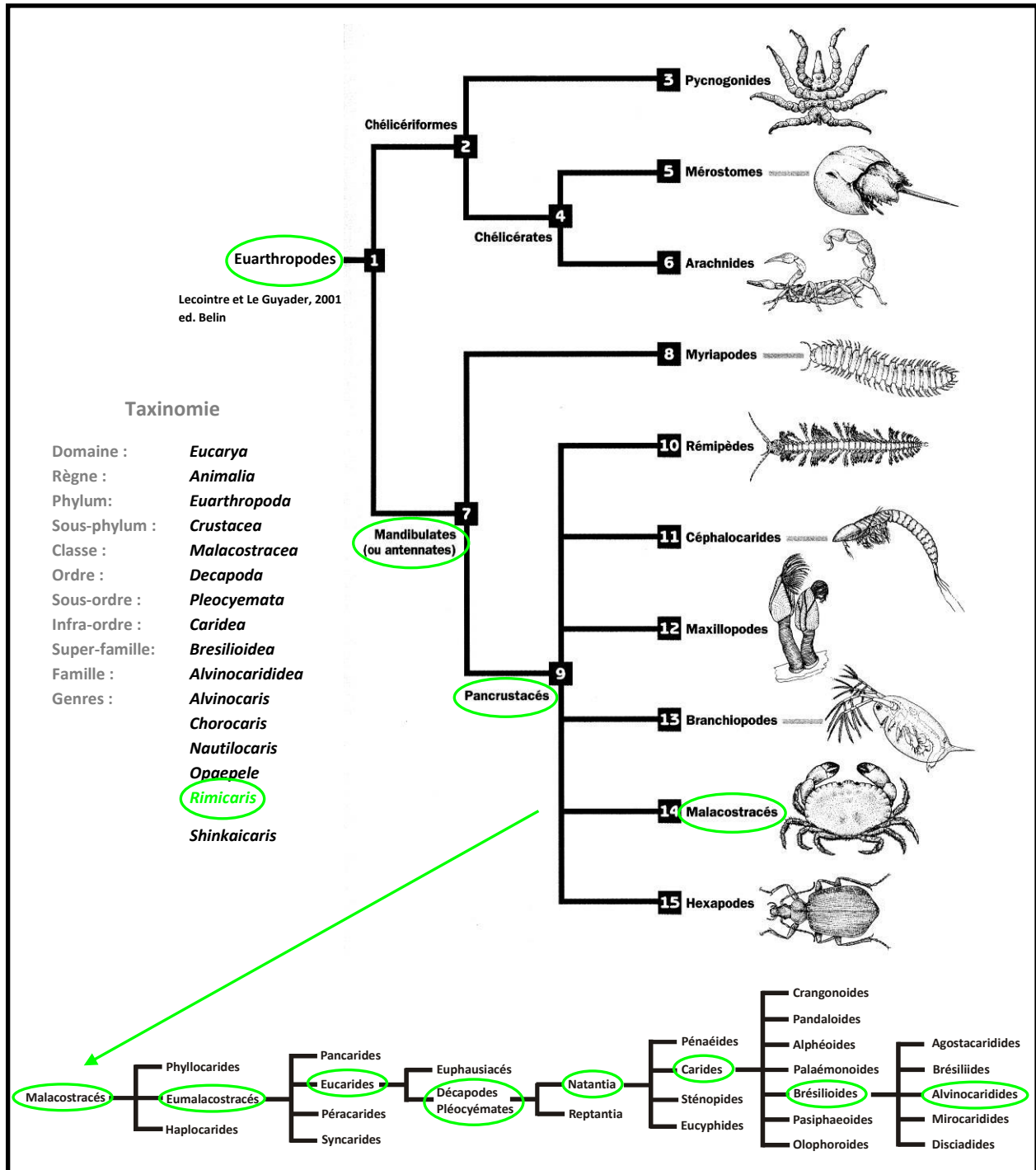


Fig.25 - Taxinomie de l'espèce *Rimicaris exoculata*.

Les caractéristiques phénotypiques les plus évidentes pour la systématique de cet invertébré décapode sont la présence d'un exosquelette souvent calcifié protégeant un corps formé de

segments (ou métamères), la présence de 5 paires de pattes locomotrices, la fusion des régions céphalique et thoracique et enfin un corps « comprimé » latéralement caractéristique des décapodes Natantia. Il faut préciser qu'il peut exister quelques différences dans la nomenclature des taxons des crustacés selon les auteurs, particulièrement dans l'ordre des décapodes. L'espèce *Rimicaris* présente des particularités qui la distinguent des autres crustacés caridés. *Rimicaris exoculata* ne possède pas de rostre (Komai et Segonzac, 2006, 2008). Elle n'a pas d'yeux mais des ocelles constitués de photorécepteurs à rhodamine probablement sensibles dans les infrarouges qui lui permettent de capter les faibles intensités lumineuses, qui correspondraient plus à des émissions thermiques (Pelli et Chamberlain, 1989 ; O'Neill et al., 1995 ; Nuckley et al., 1996 ; Van Dover et al., 1996 ; Chamberlain, 2000). Les stades de développement de *R. exoculata* sont très caractéristiques. Peu de données sont disponibles sur les stades larvaires. Des femelles gravides peuvent être observées et collectées au sein des agrégats. Elles portent des œufs oranges dans une gangue jusqu'à leur éclosion. Mais le stade pélagique de la larve n'a à ce jour pas encore été observé au niveau des sites hydrothermaux. Les larves de *R. exoculata* pourraient suivre les courants profonds comme c'est le cas du stade larvaire du mytilidae *Idasola argentea* ou d'autres invertébrés marins profonds ce qui leur confère une capacité de dispersion pouvant atteindre des centaines de kilomètres (Lutz et al., 1980, 1984 ; Marsh et al., 2001). Concernant les premiers stades juvéniles (les premiers stades identifiés mesurent environ 1,2 cm de long), le céphalothorax représente un peu plus d'un tiers de la longueur du corps de l'animal. La coloration orange des juvéniles est due à d'importantes réserves lipidiques riches en caroténoïdes (**Fig.26A**). Ces réserves disparaissent progressivement au fur et à mesure du développement de la crevette et de l'évolution de sa morphologie : la proportion du céphalothorax augmente au fil des mues (**Fig.26B**) jusqu'à acquérir la morphologie adulte. Celle-ci est très différente de celle des premiers stades juvéniles (**Fig.26D-E**). *R. exoculata* adulte peut atteindre une taille de plus de 6 cm de long et sa cavité céphalothoracique est hypertrophiée. Elle représente près de la moitié de la longueur du corps (**Fig.26C**). Les lames branchiostèges sont très incurvées ce qui piège les appendices buccaux comme les maxillipèdes à l'intérieur de la cavité céphalothoracique.

L'étonnante morphologie des crevettes juvéniles par rapport aux adultes a prêté à confusion dans l'histoire de la description de *R. exoculata*. Ainsi, il existe des espèces synonymes aux individus adultes *R. exoculata* décrits en 1986 (Williams et Rona, 1986) : *Iorania concordia* (Vereshchaka, 1996) et *R. aurantiaca* (Martin et al., 1997) ont été décrites comme de nouvelles espèces mais correspondent aux premiers stades juvéniles de *R. exoculata*. Cette erreur a été rectifiée par des analyses de biologie moléculaire (Shank et al., 1998) et une revue de la position systématique du genre *Rimicaris* (Komai et Segonzac, 2008).



Fig.26 – *Rimicaris exoculata* à différents stades de développement : juvénile (A), juvénile avancé (B), adulte (C). Spécimens de *R. exoculata* adultes (flèches noires) et juvéniles dans le bac de prélèvement à la remontée des échantillons (D). « Nurserie » de *R. exoculata* observée *in situ* sur le site hydrothermal Logatchev montrant les adultes (clairs) encadrant les juvéniles (oranges) logés au creux de l’anfractuosités rocheuse (E).

4.2 - *Rimicaris exoculata* : « Its way of life »

[Comportement d'une crevette aveugle...](#) - *R. exoculata* vit autour des cheminées hydrothermales actives le long de la ride médio-Atlantique, principalement sur les sites Rainbow, TAG, Snake Pit et Logatchev où des populations importantes ont été décrites (**Fig.33A**). Elle est très

mobile et forme des agrégats dont la densité peut approcher 2500 individus au mètre carré (Segonzac et al., 1993). Sa population dense en fait l'espèce dominante de la macrofaune des sites qu'elle colonise. Cette espèce vit entre 10 et 30°C (Schmidt et al., 2008) dans la zone de fluides dilués mais il lui arrive de passer brièvement dans des fluides beaucoup plus chauds. L'observation des agrégats de crevettes révèle un étonnant comportement rappelant celui des manchots en colonies. Elles suivent un mouvement perpétuel, du centre vers la périphérie des agrégats, comme si elles cédaient ou fuyaient leur place plus au chaud à des congénères évoluant dans la zone périphérique plus froide de l'agrégat, ou bien comme si les crevettes en périphérie forçaient le passage vers le centre de l'agrégat. Mais ce comportement n'est *a priori* pas basé sur une quelconque hiérarchie sociale. Cependant, une ségrégation peut parfois être observée. Sur les sites Snake Pit (film de Cameron et Quale, 2004) et Logatchev (vidéos Ifremer de la campagne Serpentine 2007), les juvéniles sont regroupés dans une cavité rocheuse, non loin des adultes, comme si cela représentait une « nurserie » (**Fig.26E**).

[...ou comment évoluer sans canne blanche](#) - Concernant le comportement individuel de la crevette *R. exoculata*, elle semble ni prédatrice, ni nécrophage. Elle apparaît gratter constamment les parois des cheminées hydrothermales actives. L'aspect de la roche sous les agrégats de crevettes est d'ailleurs différent de celui des cheminées non colonisées. Et pourtant, les maxillipèdes Mp2 (ou pattes mâchoires) sont bloquées dans sa cavité céphalothoracique hypertrophiée (Segonzac et al., 1993). Les lames branchiostèges (ou branchiostégites), replis latéraux de la carapace du céphalothorax, sont largement recourbées sous l'animal (**Fig.27**). Ceci, allié au mouvement d'eau, forme un micro-environnement presque clos.

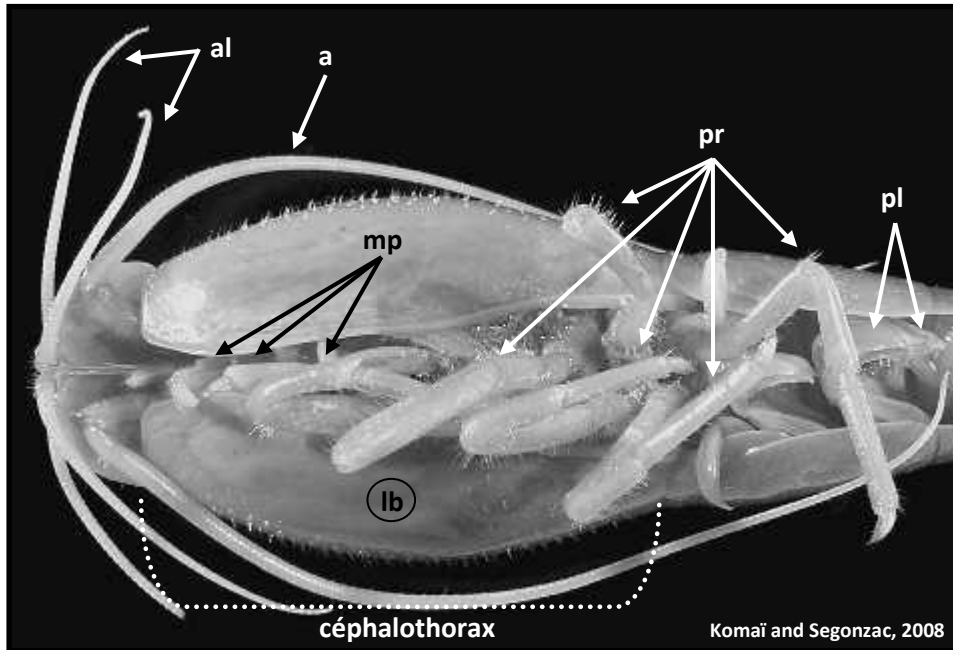


Fig.27 – Vue ventrale de *Rimicaris exoculata* et de ses appendices buccaux et locomoteurs. a = antenne, al = antennules, mp = maxillipèdes, pr = péréiopodes, pl = pléopodes, lb = lame branchiostège.

Le flux d'eau dans le céphalothorax entre par la partie avant inférieure, va irriguer la cavité branchiale où l'eau s'appauvrit en oxygène et s'enrichit en dioxyde de carbone, ammoniacque et urée puis passe dans la partie supérieure avant d'être évacué. Les parties inférieure et supérieure du céphalothorax sont séparées par la scaphognathite (dorsale) et l'exopodite (ventrale) du premier maxillipède (**Fig.28a**). Le mouvement de battement de la scaphognathite crée le flux d'eau permettant l'irrigation des branchies. L'exopodite représente une sorte de barrière séparant les cavités céphalothoraciques inférieure (ventrale) et supérieure (dorsale). Ces deux pièces buccales portent de nombreuses soies et sont hypertrophiées (**Fig.28b**).

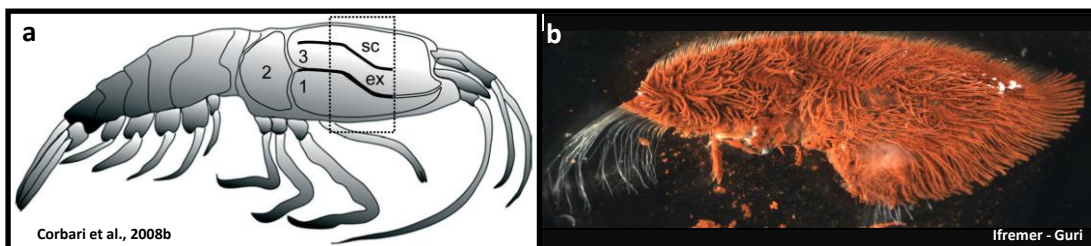


Fig.28 - (a), Schéma de la vue interne de la cavité céphalothoracique de *R. exoculata*. (b), Observation à la loupe binoculaire d'une scaphognathite. Ses nombreuses soies sont couvertes d'oxydes de fer à l'exception des longues soies blanches (à gauche) qui nettoient la cavité branchiale. Sc = Scaphognathite, Ex = Exopodite, 1 = cavité céphalothoracique inférieure, 2 = cavité branchiale, 3 = cavité céphalothoracique supérieure.

Les pièces et appendices buccaux ainsi que la paroi interne de la cavité céphalothoracique sont recouverts d'une croûte d'oxydes de fer associés à des bactéries (**Fig.28b**). La progression de la

formation des oxydes de fer suit le cycle de mue de *R. exoculata* (**Fig.29**, Corbari et al., 2008b). Ce cycle est estimé à 10 jours (Corbari et al., 2008b), ce qui est très rapide comparé à celui de la crevette littorale *Penaeus japonicus* ayant un cycle de 21 jours.

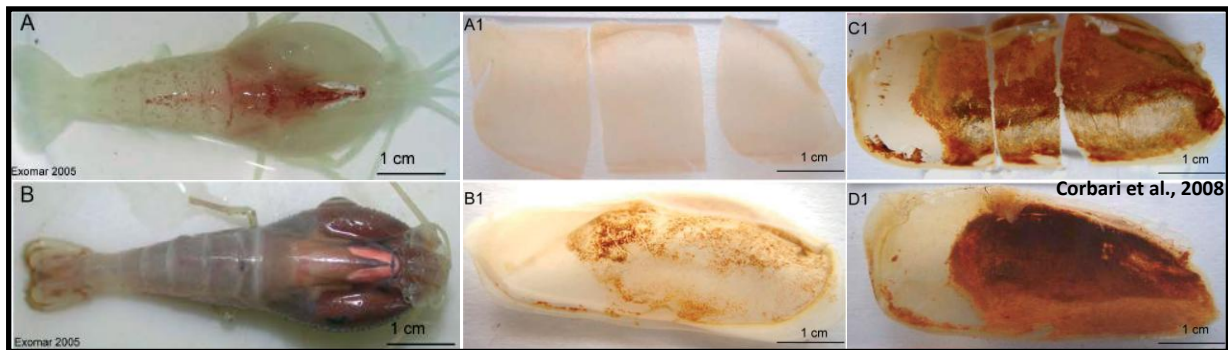


Fig.29 - *Rimicaris exoculata* en phase post-ecdysiale (A) et fin de pré-ecdysiale (B). Vues internes des lames branchiostèges en phase post-ecdysiale (A1), anecdyssiale (B1), pré-ecdysiale précoce (C1) et pré-ecdysiale avancée (D1).

La mue est un phénomène représentant une importante dépense énergétique pour les arthropodes. Le cycle de mue comprend une période de repos tégumentaire (ou anecdyssie) durant laquelle l'organisme refait ses réserves qui serviront pour la prochaine période de mue ou en cas de carence nutritive. C'est l'unique phase du cycle dont la période est variable selon les organismes. Les périodes post- et pré-ecdysiales impliquant des mécanismes biologiques (synthèse de la nouvelle cuticule, lyse de l'ancien tégument...) sont incompressibles. Chez *R. exoculata*, la phase de repos tégumentaire est donc courte compte-tenu de la durée du cycle de mue.

4.2 - *Rimicaris exoculata* : un hôte plutôt chaleureux...

Différentes études mettent en évidence une colonisation microbienne dense et organisée de la paroi interne des lames branchiostèges et des appendices buccaux (Van Dover et al., 1988 ; Segonzac et al., 1993 ; Casanova et al., 1993 ; Polz et Cavanaugh, 1995 ; Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008b). Il est possible que la présence de ces épibiontes céphalothoraciques soit liée, directement ou indirectement, au cycle de mue. La présence d'une communauté au niveau du tractus digestif a également été révélée par une étude moléculaire (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003).

[L'épibiose du céphalothorax](#) - Différentes études se sont penchées sur les épibiontes de la cavité céphalothoracique (Van Dover et al., 1988 ; Segonzac et al., 1993 ; Casanova et al., 1993 ; Polz et Cavanaugh, 1995 ; Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a-b ; Petersen et al., 2010). Dans un premier temps, l'étude des épibiontes de spécimens de *R. exoculata* du site Snake Pit les a affiliés

à un unique phylotype bactérien affilié aux *Epsilonproteobacteria*, et suggérés comme étant thiotrophes (Polz et Cavanaugh, 1995). Mais de récentes études de spécimens du site Rainbow montrent divers morphotypes (bâtonnets, filaments fins ou larges dont les sous-unités peuvent être en forme de cylindre ou de disque, coques avec membranes internes, **Fig.30A-B**, Zbinden et al., 2004, 2008; Corbari et al., 2008b) organisés en un tapis microbien dense (**Fig.30C**).

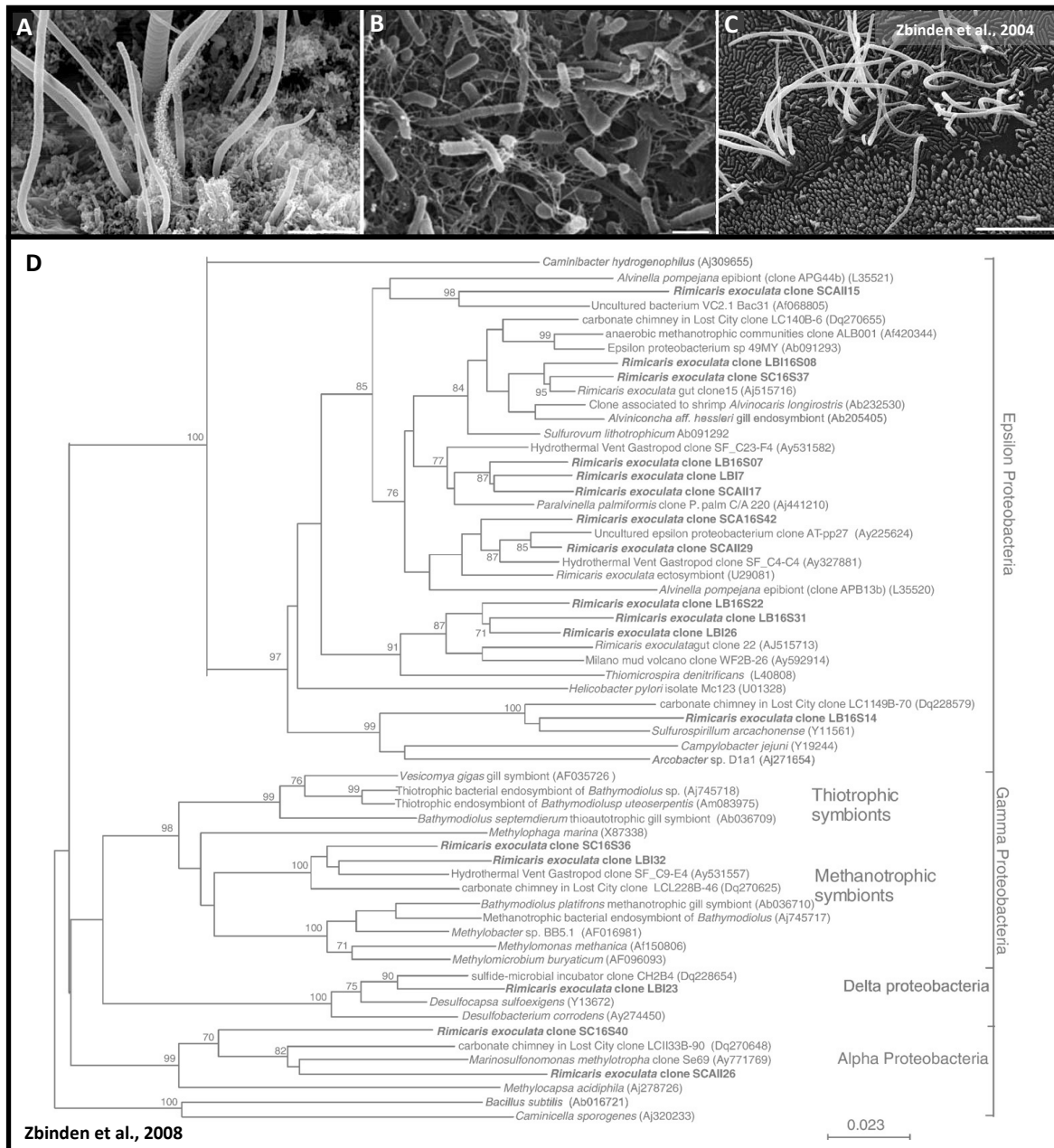


Fig.30 - (A-C), différents morphotypes et organisation des épibiontes de la cavité céphalothoracique de *R. exoculata* vus en microscopie électronique à balayage. Barres d'échelles: A-C = 10 μm ; B = 1 μm . (D), arbre phylogénétique des épibiontes céphalothoraciques de *R. exoculata* (Neighbour-joining et ré-échantillonnage 500 bootstraps).

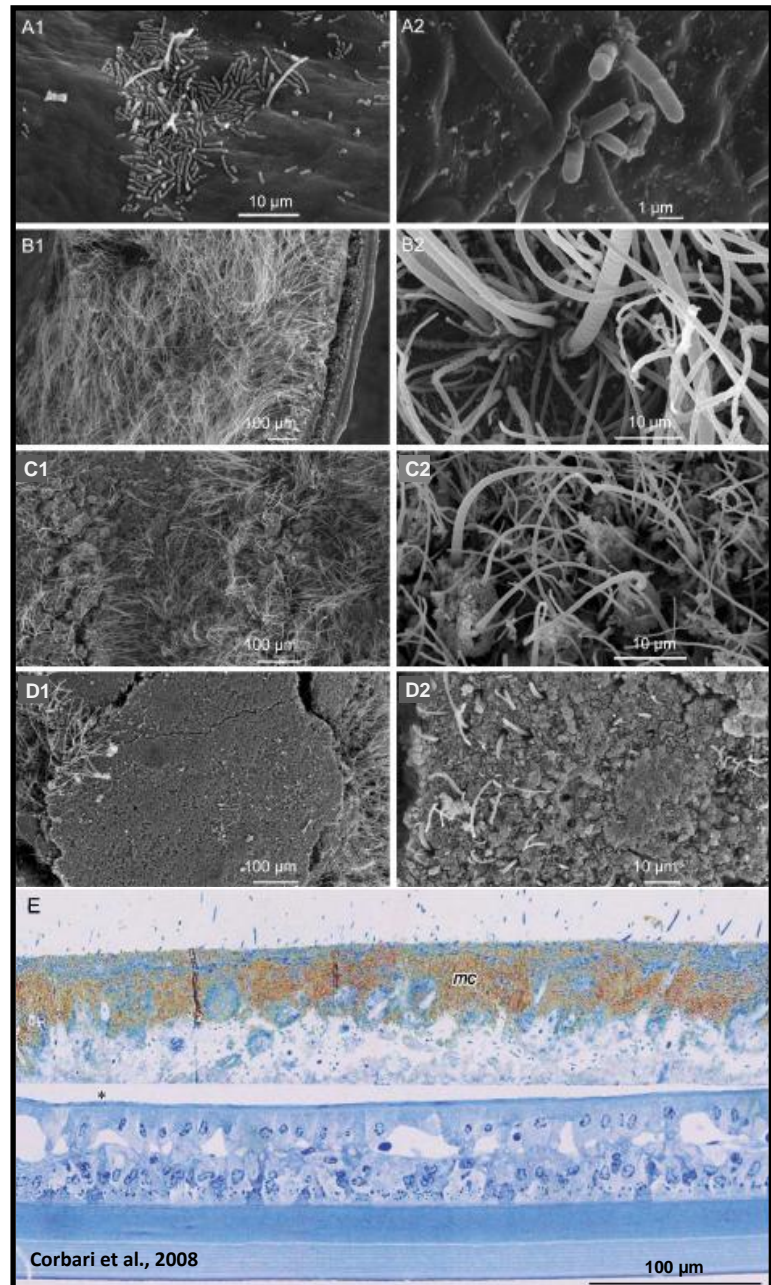
Ces épibiontes sont en association forte avec des oxydes de fer laissant supposer une activité ferroxidante (Zbinden et al., 2004; Corbari et al. 2008a-b). L'analyse moléculaire révèle la présence de

plusieurs phylotypes bactériens (**Fig.30D**) et de gènes impliqués dans les métabolismes d'oxydation des sulfures et du méthane (Zbinden et al., 2008). La compilation des données moléculaires, des observations microscopiques des épibiontes et des conditions environnementales laissent supposer que trois métabolismes co-existent dans la communauté microbienne colonisant la cavité céphalothoracique : la sulfo-oxydation, la méthanotrophie et la ferro-oxydation. Le potentiel métabolique de cette communauté microbienne augmente la valence écologique de l'association symbiotique qui présente ainsi une forte capacité d'adaptation aux conditions géochimiques très variables dans les écosystèmes hydrothermaux.

La localisation des épibiontes sur la cuticule des appendices buccaux et la face interne de la branchiostégite implique que le tapis microbien est perdu à chaque exuviation. La recolonisation de la cavité céphalothoracique se fait progressivement, par îlots de colonisation (Corbari et al., 2008b). La croissance des îlots microbiens commence avec des bâtonnets, puis des filaments se développent au cœur de ces îlots. La densité de la population augmente au fur et à mesure que le cycle de mue de l'hôte évolue. La croissance microbienne est accompagnée d'un dépôt d'oxydes de fer. Cette minéralisation s'effectue en même temps que la croissance des épibiontes filamenteux jusqu'à former une croûte épaisse responsable du changement de coloration de l'animal (dépôt rouge d'oxydes de fer) au cours du cycle de mue (**Fig.31**). En phase pré-ecdysiale avancée, cette croûte est si épaisse qu'elle couvre presque totalement la longueur des épibiontes filamenteux. Il est possible que ceux-ci soient d'ailleurs « étouffés » par le minéral, ce qui est corrélé avec l'observation de nombreuses figures de lyse parmi les épibiontes filamenteux en phase pré-ecdysiale avancée.

Fig.31 - (A1-D1), étapes de la colonisation microbienne de la paroi interne de la lame branchiostège de *Rimicaris exoculata* au cours du cycle de mue observée en microscopie électronique à balayage. (A), batonnets et filaments sur un individu post-ecdysial illustrant la naissance des filaments bactériens au cœur des ilots de colonisation ; (B), filaments fins et épais sur un individu anecdysial ; (C), dépôt d'oxydes de fer autour des filaments sur un individu en phase pré-ecdysiale précoce ; (D), croûte dense d'oxydes de fer recouvrant les filaments sur un individu en phase pré-ecdysiale avancée.

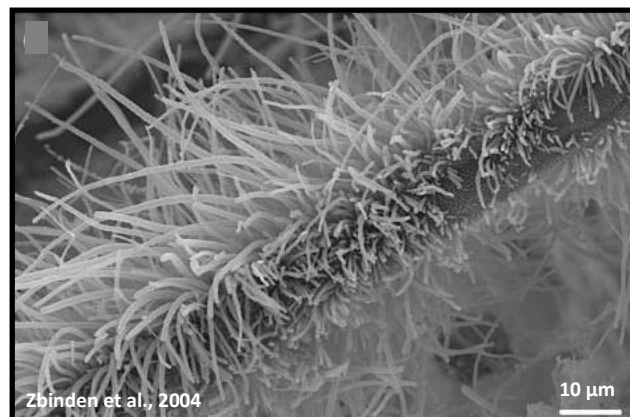
(E), coupe semi-fine d'une lame branchiostège de *R. exoculata* illustrant la minéralisation dense du tapis microbien sur un individu en phase pré-ecdysiale avancée.



L'analyse du développement des épibiontes de la cavité céphalothoracique pose la question d'un lien entre le cycle de mue de l'hôte et sa colonisation. Une hypothèse serait qu'il y aurait effectivement un lien mais dans quel sens ? Il semble que l'exuviation ait lieu au moment où la communauté microbienne est la plus dense et où la minéralisation est la plus importante (certains épibiontes sont probablement morts). L'hypothèse reposerait plutôt sur le rôle des épibiontes pour *R. exoculata* : (1), ce n'est pas une épibiose mutualiste. L'hôte provoque sa mue parce que l'encombrement dû à la minéralisation dans sa cavité céphalothoracique engendre une trop forte dépense énergétique (les oxydes de fer peuvent alourdir l'hôte et gêner sa mobilité, ils peuvent gêner la circulation d'eau ou les phénomènes naturels d'absorption à travers la cuticule interne de la branchiostégite). (2), il s'agit

d'une épibiose mutualiste. Le déclin du tapis microbien étouffé par les oxydes de fer, entraîne la mue, soit via un signal des épibiontes à l'hôte, soit parce que les épibiontes ne sont plus suffisamment efficaces par rapport aux besoins de l'hôte. A ce jour, l'existence d'une relation entre la crevette et les épibiontes céphalothoraciques n'est pas prouvée. Mais les modifications morphologiques de la cavité céphalothoracique et des appendices associés semblent favoriser la colonisation microbienne. Certains auteurs la considèrent même comme un incubateur naturel, notamment par la présence des soies des scaphognathites, qualifiées de soies bactériophores (Segonzac et al., 1993 ; Casanova et al., 1993). Chacune des soies recouvrant la scaphognathite hypertrophiée (**Fig.28b**) est elle-même recouverte d'épibiontes filamenteux (**Fig.32**).

Fig.32 - Soie bactériophore d'une scaphognathite colonisée par des épibiontes filamenteux observée en microscopie électronique à balayage sur un spécimen post-ecdysial de *R. exoculata*.



Les adaptations morphologiques de *R. exoculata* seraient donc un argument en faveur de l'hypothèse d'une épibiose mutualiste au niveau de la cavité céphalothoracique. Peut-être jouent-ils un rôle dans la détoxification des sulfures et/ou des métaux lourds. D'après la minéralisation des oxydes de fer formant une gangue autour des épibiontes filamenteux, cela semble être un phénomène en partie biotique. Il est donc possible que cette communauté ait un métabolisme d'oxydation du fer. Des cristaux de sulfure de fer ont été observés dans la croûte de minéraux. Cette gangue pourrait piéger les sulfures par simple attirance chimique et physique. Mais peut-être ces épibiontes jouent-ils aussi un rôle nutritif pour l'hôte ? En effet, celui-ci a d'importants besoins énergétiques compte-tenu de son cycle de mue rapide et l'intense activité de la communauté microbienne (sur la base de la vitesse de précipitation des oxydes de fer) pourrait présenter une rentabilité de production non négligeable.

[L'épibiose du tractus digestif](#) - Peu de travaux ont été consacrés à l'étude du tractus digestif de *R. exoculata*. Le contenu digestif est une pâte constituée principalement de minéraux (sulfures et oxydes de fer) probablement issus des parois des cheminées hydrothermales et de quelques fragments de cuticule qui proviendraient de l'ingestion des exuvies des congénères (Segonzac et al., 1993 ; Casanova et al., 1993). Aucun micro-organisme intègre n'est observé dans l'estomac et aucune colonisation microbienne du mésentéron ou du proctodeum de la crevette n'a été décrite. Des

expériences à l'aide de marqueurs isotopiques révèlent toutefois une fixation du carbone significative dans le tube digestif (Polz et al., 1998), ce qui suggère la présence d'un microbiote actif dans l'intestin mais sans confirmation visuelle. En 2003, Zbinden et Cambon-Banovita réalisent une étude préliminaire en microscopie optique de l'estomac et de l'intestin afin de confirmer les hypothèses sur l'existence d'un microbiote dans le tube digestif mais aucun micro-organisme intègre n'est observé. L'analyse moléculaire sera alors effectuée uniquement sur l'intestin. Elle révélera une diversité réduite, représentée par trois groupes phylogénétiques : les *Epsilonproteobacteria* pour moitié, les *Deferribacterales* et *Entomoplasmatales* pour un quart chacun. Les séquences de clones obtenues sont affiliées à des espèces pas ou très peu représentées dans l'environnement hydrothermal. Par exemple, les *Deferribacterales* sont proches du genre *Geovibrio*, inféodé aux puits de pétrole ou aux écosystèmes d'eau douce mais qui n'a jamais été retrouvé dans les écosystèmes hydrothermaux marins profonds. La mise en évidence de cette communauté microbienne sur un plan moléculaire renforce l'hypothèse d'une épibiose mutualiste avec *R. exoculata*. Mais il est difficile sans une confirmation visuelle (microscopie optique, électronique, épifluorescence) de déterminer si cette communauté est résidente ou transitoire. D'autant plus que l'analyse moléculaire a été réalisée sur des tubes digestifs dans leur entier, c'est-à-dire avec le bol alimentaire.

[Un mode de nutrition hypothétique](#) - *Rimicaris exoculata* est un animal, donc par définition, un organisme hétérotrophe. Et pourtant, les différentes analyses de son contenu digestif révèlent une grande quantité de particules minérales et son comportement ne semble pas être celui d'un prédateur ou d'un nécrophage. Son activité intense en constante mobilité autour de cheminées hydrothermale et son cycle de mue rapide impliquent d'importantes dépenses énergétiques. La crevette doit donc compenser cela par un apport important en énergie. Dans l'écosystème où elle vit, dépourvu d'énergie lumineuse, pauvre en oxygène et oligotrophe, les micro-organismes chimioautotrophes sont les producteurs primaires. Il existe donc différentes hypothèses intégrant les micro-organismes directement ou indirectement au mode de nutrition de *R. exoculata*. Trois stratégies sont généralement proposées : (1), les micro-organismes ingérés avec les particules minérales des parois des cheminées hydrothermales ou avec l'eau environnante constituent la source nutritive principale (Van Dover et al., 1988). Des analyses en $\delta^{13}\text{C}$ ont cependant montré que ce n'était pas la source nutritive exclusive (Polz et al., 1998). (2), les épibiontes de la cavité céphalothoracique sont la source nutritive principale par grattage du tapis microbien (Casanova et al., 1993 ; Polz et Cavanaugh, 1995 ; Gebruk et al., 1997, 2000 ; Rieley et al., 1999), par ingestion des épibiontes et de l'exuvie après la mue ou par transfert trans-cuticulaire de matière organique (Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008b). Cependant la configuration de l'articulation des chélipèdes (Segonzac et al., 1993) montre qu'il est difficile pour cet appendice de gratter le tapis

microbien des lames branchiostèges et l'observation de celui-ci (Zbinden et al., 2004) ne révèle aucune altération mécanique. (3), il existe une communauté microbienne spécifique (commensale ou mutualiste) dans le tractus digestif qui représente une source nutritive alternative (Polz et al., 1998 ; Pond et al., 2000 ; Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003). Bien sûr, chacune des hypothèses n'exclue pas les autres et plusieurs stratégies peuvent co-exister. A ce jour, l'activité et le rôle des communautés microbiennes céphalothoracique et intestinale demeurent inconnus. La nature des relations entre *R. exoculata*, les communautés microbiennes associées et son environnement restent à définir.

Mon travail sur les communautés microbiennes associées au tractus digestif de *R. exoculata* fait suite à deux travaux publiés (Polz et al., 1998 ; Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003) qui suggéraient la présence de micro-organismes dans le tube digestif de cette crevette. Cependant, la structure, la localisation ou le caractère obligatoire ou non de ces communautés n'étaient pas décrits.

Mon travail de recherche s'est donc structuré en quatre parties :

- (1), l'étude de la diversité microbienne des épibiontes et la mise en évidence d'une communauté microbienne résidente (expériences de jeûne en incubateur pressurisé).
- (2), la mise en évidence d'un éventuel lien entre l'épibiose et la localisation géographique de l'hôte et les conditions géochimiques environnementales (différents sites étudiés le long de la MAR).
- (3), l'analyse de l'activité des épibiontes en fonction du stade de mue et du niveau de nutrition de l'hôte (expériences d'enrichissement du milieu environnant en différents composés en incubateur pressurisé, analyse des communautés microbiennes actives par RT-PCR).
- (4) les interactions entre *R. exoculata* et son environnement (recherche de champignons associés à la crevette).

Lors d'une étude parallèle au point 1, la diversité microbienne associée au tractus digestif de l'amphipode hydrothermal *Ventiella sulfuris* a été analysée.

Mon travail de thèse s'est divisé en temps. L'un à bord des navires océanographiques afin de procéder aux collectes des échantillons et de réaliser les études de physiologie en aquarium pressurisé. L'autre en laboratoire afin de réaliser les travaux de culture de micro-organismes, de biologie moléculaire, de microscopie et de bioinformatique.

RESULTATS

Chapitre 0

**De l'étude de terrain
au travail en laboratoire**

CHAPITRE 0

DE L'ETUDE DE TERRAIN AU TRAVAIL EN LABORATOIRE

1 - La collecte des échantillons ou comment aller à la pêche aux crevettes ?

La première étape dans l'étude de l'épibiose de *Rimicaris exoculata* est la collecte des échantillons. L'étude de ce crustacé inféodé aux écosystèmes hydrothermaux marins profonds présente certaines difficultés auxquelles il faut s'adapter. La mise en œuvre de campagnes océanographiques est nécessaire à la collecte des tels spécimens. Ce décapode vivant au niveau de certains sites hydrothermaux actifs situés le long de la ride médio-Atlantique (**Fig.33A**), cela implique l'utilisation de moyens lourds et le développement d'outils spécifiques, tel un navire océanographique et un sous-marin équipé d'outils de prélèvement spécialisés (**Fig.33B-C-D**). Les outils de prélèvement sont développés en fonction des échantillons à prélever, comme des poissons, des crustacés, des bivalves, mais aussi des cheminées hydrothermales, du sédiment et de l'eau. Les sous-marins sont aussi équipés d'outils de mesures *in situ* afin d'obtenir par exemple des relevés de température et de pH et les concentrations de certains éléments chimiques. La collecte de spécimens d'animaux vivants est délicate car elle doit être réalisée dans des conditions permettant de préserver les individus et de les récupérer rapidement après leur collecte. Pour *R. exoculata*, les individus sont récupérés à bord du navire océanographique entre deux et trois heures après leur collecte, selon la profondeur du site de prélèvement. Puis une partie des spécimens est immédiatement traitée pour diverses expérimentations en laboratoire en tant que spécimens de référence (ou témoins). L'autre partie est utilisée pour des expérimentations *in vivo* puis traitée pour des expérimentations en laboratoire à bord du navire océanographique.

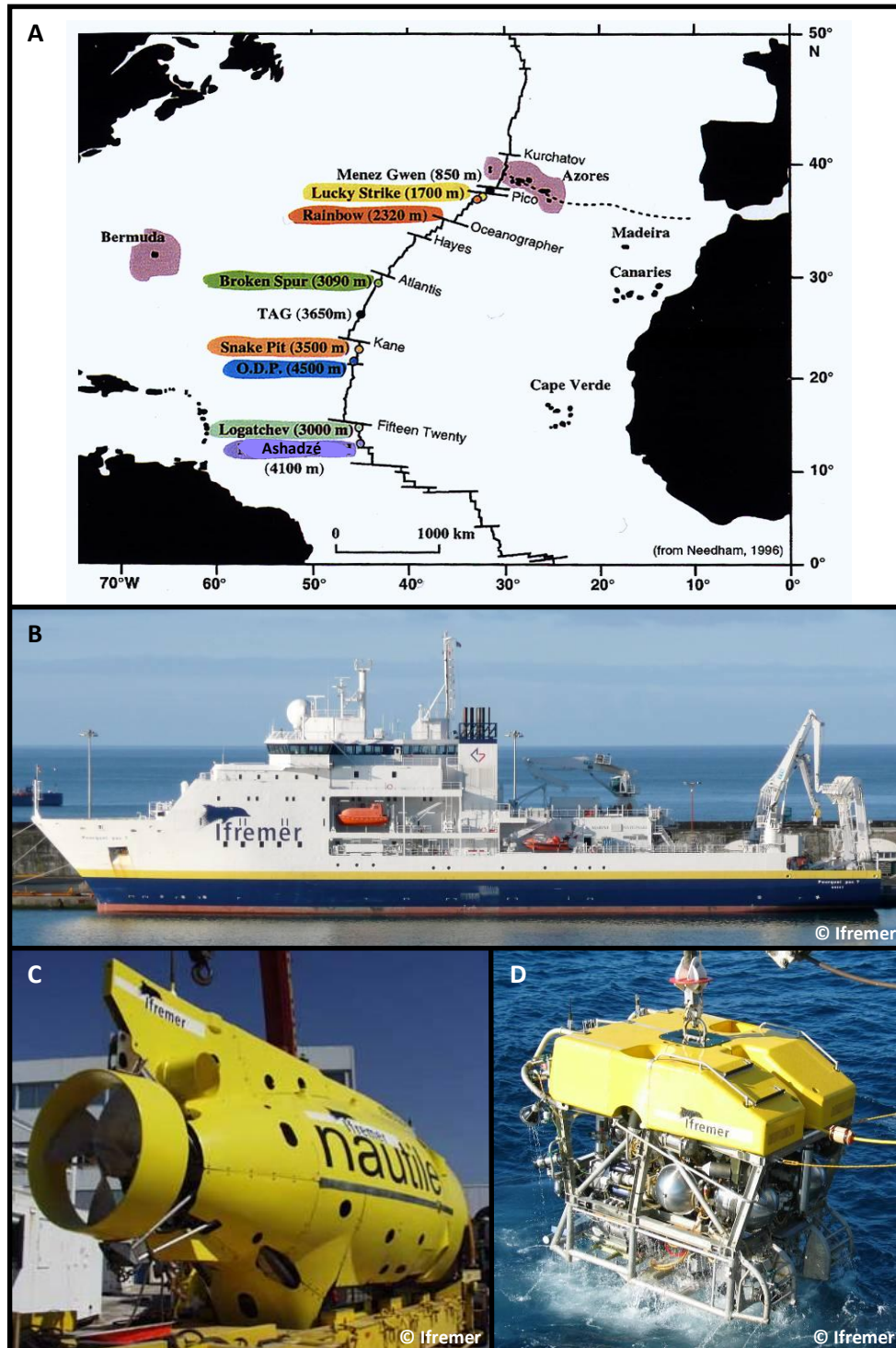


Fig.33 – Principaux sites hydrothermaux connus de la ride médio-Atlantique (A). Le navire océanographique *Pourquoi pas ?* (B) et les submersibles habité *Nautilus* (C) et non habité *Victor 6000* (D).

2 - Réflexions préliminaires à la mise en place du protocole expérimental

Le fil conducteur de l'étude d'une association mutualiste est, certes, l'acquisition, la transmission et la pérennité des symbiotes, mais aussi la nature des relations déterminant cette association. Pour l'étude des épibioses céphalothoracique et digestive de la crevette *R. exoculata*, cinq interrogations ont orienté la mise en place des expérimentations : quelle est la diversité microbienne des communautés d'épibiontes ? Y a-t-il une communauté résidente au sein de la population microbienne associée au tractus digestif de la crevette ? Quels sont les métabolismes présents chez les épibiontes ? Y a-t-il un transfert de matière entre l'hôte et ses épibiontes (symbiose trophique) ? Comment les épibiontes sont-ils acquis et transmis ?

Pour répondre à ces interrogations, il faut d'abord s'affranchir de tout micro-organisme opportuniste afin d'étudier la communauté spécifique réelle. La première difficulté sera donc d'obtenir des hôtes chez qui les populations microbiennes allochtones ne sont pas présentes puisque les premiers stades de développement de la crevette, qui pourraient être aposymbiotiques, n'ont jamais été observés. Concernant l'activité et le rôle des communautés épibiontes céphalothoracique et intestinale de *R. exoculata*, encore inconnus, il faut procéder par hypothèses. La composition chimique des sites hydrothermaux étudiés dans notre étude, qu'ils soient mantelliens comme Rainbow ou « classiques basaltiques » comme TAG montre la possibilité de métabolismes tels que l'oxydation du fer, du méthane, des composés organiques simples et des composés soufrés (Charlou et al., 2002 ; Schmidt et al., 2008). Ceci est corrélé à des observations microscopiques montrant une croûte d'oxydes de fer étroitement associée au tapis microbien de la cavité céphalothoracique pour la ferro-oxydation (**Fig.31 C1 à E**) et à certaines structures observées sur ces micro-organismes pour la méthanotrophie (membranes internes, typiques des bactéries méthanotrophes) (Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a, 2008b). Les données moléculaires obtenues (Zbinden et al., 2008) confirment l'existence de l'activité méthanotrophe chez les épibiontes céphalothoraciques, le gène *pmoA* codant une enzyme clé de ce métabolisme. Ces données mettent aussi en évidence l'existence d'une activité sulfures dépendante traduite par la présence du gène de l'APS (enzyme clé du métabolisme thiotrophe). Les expérimentations concernant l'activité et le rôle des communautés épibiontes de *R. exoculata* menées seront donc focalisées sur l'étude des métabolismes impliqués dans ces trois cycles biogéochimiques : le cycle du soufre, le cycle du méthane et le cycle du fer.

3 - Approche *in vivo* : méthodologie de l'étude « sur le terrain »

3.1 - Appareillage spécifique

Outre le prélèvement des échantillons, l'expérimentation *in vivo* sur des organismes marins profonds doit faire face à une difficulté majeure : la pression. En effet, les spécimens subissent la décompression lors de leur remontée (*R. exoculata* prélevée sur le site Rainbow par exemple passe de 23 MPa à 0.1 MPa en 2 heures). Les arthropodes et les bivalves supportent relativement bien ces variations, et peuvent survivre quelques heures à pression atmosphérique. Ces conditions sont par contre létales pour certains organismes tels que les annélides ou les poissons. Une équipe française avec laquelle j'ai pu collaborer a donc développé un système permettant de maintenir le prélèvement à la pression hydrostatique *in situ* jusqu'à l'ouverture du système : le PERISCOP™ (Projet d'Enceinte de Remontée Isobare Servant la Capture d'Organismes Profonds, Shillito et al., 2008, **Fig.34A-B-C**). Cette équipe a également mis au point un aquarium pressurisé qui permet d'incuber les animaux à la pression hydrostatique *in situ* une fois à bord du navire : l'IPOCAMP™ (Incubateur Pressurisé pour l'Observation et la Culture d'Animaux Marins Profonds, Shillito et al., 2001, **Fig.34D**).

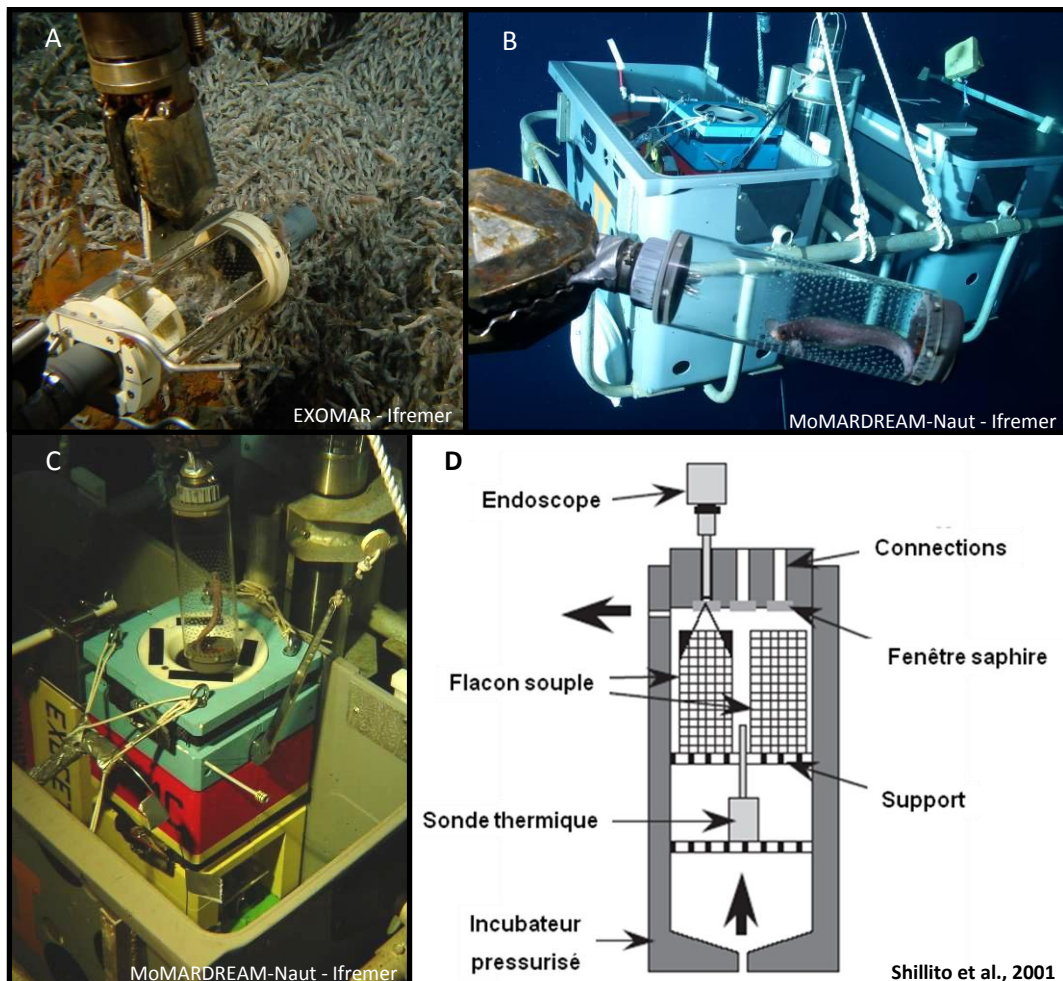


Fig.34 – Outils spécifiques pour le prélèvement et l'expérimentation *in vivo* des animaux marins profonds : le PERISCOP™ (A, cellule de prélèvement ; B, cellule de prélèvement au premier plan et PERISCOP™ au second plan ; C, PERISCOP™) et l'IPOCAMP™ (D, schéma de la structure de l'IPOCAMP™).

J'ai ainsi pu réaliser des expérimentations sur des animaux vivants grâce à l'incubateur pressurisé au cours de la campagne MoMARDREAM-Naut en 2007 (trois semaines) sur le site Rainbow (**Fig.33A**). Les périodes d'incubation pouvaient atteindre plusieurs jours. Mon travail a également porté sur l'exploitation des échantillons collectés au cours des campagnes océanographiques EXOMAR en 2005 sur les sites Rainbow et TAG, Serpentine en 2007 sur les sites Logatchev et Ashadzé et MoMAR08 en 2008 (à laquelle j'ai participé, trois semaines) sur le site Rainbow (**Fig.33A**). Les manipulations *in vivo* n'ont été réalisées qu'au cours des campagnes EXOMAR et MoMARDREAM-Naut, les autres campagnes ont permis la collecte de spécimens de différents sites et/ou à différents stades de développement.

Aucun spécimen de *R. exoculata* aposymbiotique n'a, à ce jour, été observé. Les expérimentations *in vivo* sur ce modèle sont donc réalisées sur l'hôte avec ses épibiontes.

3.2 - Expérimentations pour l'étude de la communauté épibionte autochtone

L'incubateur pressurisé m'a permis d'effectuer des expériences de jeûne sur les crevettes en les maintenant dans de l'eau de mer stérile. Ceci a pour but de vider naturellement le tractus digestif de l'hôte de son bol alimentaire afin d'éliminer complètement la communauté microbienne allochtone et de ne conserver que la communauté résidente. L'occurrence et la caractérisation des épibiontes autochtones associés au tractus digestif ont ainsi pu être réalisées par différentes approches : biologie moléculaire, microscopie photonique, électronique et à épifluorescence.

3.3 - Expérimentations pour l'étude de l'activité et du rôle de la communauté épibionte

Des expériences d'enrichissement de l'eau de mer stérile, dans laquelle baignent les spécimens, en différents donneurs d'énergie ont également été réalisées sous pression dans l'incubateur durant les campagnes EXOMAR et MoMARDREAM-Naut. Ces données m'ont permis d'analyser l'effet des conditions géochimiques du milieu sur l'activité des populations microbiennes associées à *R. exoculata*. Les sources d'énergie (donneurs et accepteurs d'électrons) et les concentrations utilisées ont été choisies en fonction des données bibliographiques sur cette association mutualiste, le fonctionnement des métabolismes ciblés et les mesures géochimiques *in situ*.

[Le métabolisme du soufre](#) - Dans les écosystèmes hydrothermaux dits « classiques », l'oxydation des sulfures est usuellement la principale source d'énergie pour les micro-organismes chimiosynthétiques. Cette réaction a lieu en présence d'oxygène et permet d'oxyder l'hydrogène sulfuré en soufre puis en sulfate : $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$. Elle tient un grand rôle dans les mécanismes de

détoxication, notamment dans le cadre des symbioses (Powell et Somero, 1986 ; Stein et al., 1988). En effet, l'hydrogène sulfuré est toxique pour la respiration aérobie : il inhibe la cytochrome oxydase. Il est également toxique pour les organismes possédant un pigment respiratoire comme l'hémoglobine car il représente un compétiteur de l'oxygène se fixant de façon irréversible sur la protéine, sauf adaptation particulière comme chez *R. pachyptila*. Les concentrations en sulfures utilisées lors des expérimentations *in vivo* et la durée de ces dernières doivent donc être compatibles avec la bonne santé physiologique de l'hôte. Les sources d'énergie utilisées pour l'étude de ce métabolisme sont l'hydrogène sulfuré, le soufre élémentaire et le thiosulfate.

Le métabolisme du méthane - D'après les données géochimiques, l'accent est mis sur la méthanotrophie. Ce métabolisme tire son énergie de l'oxydation du méthane et des composés dérivés (**Fig.35**). Le carbone est alors assimilé à partir du formaldéhyde par la voie de la sérine ou du ribulose monophosphate chez les bactéries.

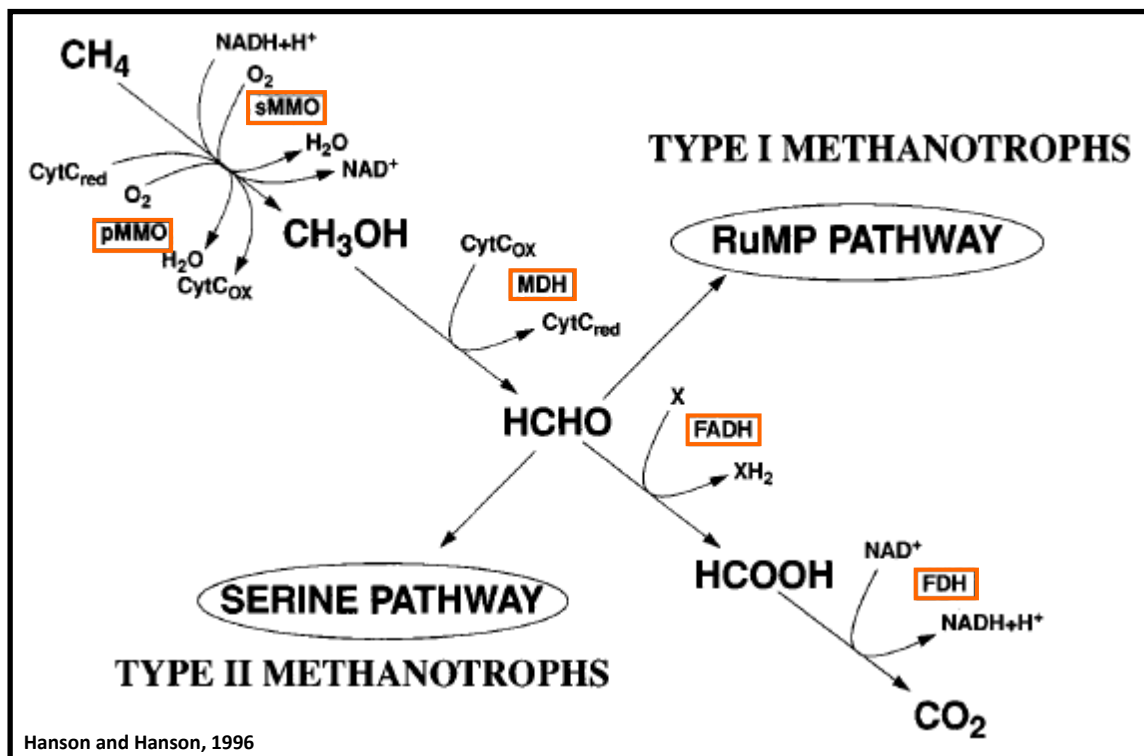


Fig.35 – Schéma des voies métaboliques des micro-organismes méthanotrophes, avec les enzymes clés encadrés en rouge (MMO = méthane mono-oxygénase particulaire (p) ou soluble (s), MDH = méthanol déshydrogénase, FADH = formaldéhyde déshydrogénase, FDH = formate déshydrogénase).

L'oxydation du méthane nécessite l'intervention de la méthane mono-oxygénase (MMO). Cette enzyme peut être particulaire (pMMO) ou sous forme soluble (sMMO). Cette réaction a lieu dans des organites spécialisés. Les bactéries méthanotrophes développent ainsi des membranes internes

formant des empilements de vésicules aplaties disposées au centre de la cellule pour les méthanotrophes de type I et X ou des paires de vésicules pariétales pour le type II. Les micro-organismes ne possédant pas la MMO sont méthylotrophes. Ils ne possèdent pas de membranes internes. Deux types de méthylotrophes peuvent être distingués : les méthylotrophes vrais, possédant le gène codant la méthanol déshydrogénase (MDH) dans leur chromosome, et les pseudo-méthylotrophes, capables d'oxyder les composés dérivés du méthane par d'autres voies métaboliques et ne possédant pas le gène de la MDH au niveau du chromosome. Cependant certaines bactéries de cette catégorie peuvent le posséder sur un plasmide et sont donc capables de métaboliser le méthanol par les mêmes voies métaboliques que les méthylotrophes vrais (Brautaset et al., 2004). Les donneurs d'électrons utilisés pour l'étude de ce métabolisme sont le méthane, le méthanol, les méthylamines (mono-, di- et triméthylamine : respectivement MMA, DMA et TMA) et le diméthylsulfide (DMS) selon l'approche et les expériences réalisées.

[Le métabolisme du fer](#) - Sur le site hydrothermal Rainbow, les fluides sont enrichis en fer II et méthane et appauvris en sulfures. Cela fait du fer II l'un des deux composés les plus énergétiquement favorables pour les métabolismes microbiens (Schmidt et al., 2008). Les mécanismes de l'oxydation aérobie du fer à pH acide sont connus : la rusticyanine qui catalyse cette réaction, est une protéine transmembranaire. La réaction d'oxydation du fer II en fer III a lieu à l'extérieur de la cellule. La présence et l'activité du complexe d'oxydation forme des sites de nucléation pour les oxydes de fer à la surface de la paroi bactérienne qui lui confère un aspect rugueux en microscopie électronique à balayage. En revanche, l'oxydation du fer à pH neutre est moins documentée. En effet, à pH neutre en conditions oxydantes, le fer II précipite spontanément en fer III sous la forme d'oxydes de fer. Il est alors difficilement accessible pour les métabolismes microbiens. C'est pourquoi, dans l'environnement, l'oxydation biotique du fer II a lieu en général à l'interface oxiq-anoxiq. C'est probablement le cas dans le micro-environnement représenté par la cavité céphalothoraciq de *R. exoculata*. Le fer III étant également relativement bien disponible pour les épibiontes, en particulier au niveau du tractus digestif, la réduction du fer est à prendre en compte. Les sources d'énergie utilisées pour l'étude de la ferro-oxydation sont l'oxygène et le fer ferreux ; et le nitrate et le fer ferriq pour la ferro-réduction.

[Expérimentations in vivo](#) - Pour compléter le travail sur les communautés épibiontes de *R. exoculata*, j'ai effectué des expérimentations *in vivo* en incubateur pressurisé afin de déterminer l'activité et le rôle des communautés épibiontes. J'ai réalisé des expériences de marquage de différents donneurs d'énergie et/ou source de carbone pour micro-organismes hétérotrophes et autotrophes durant la campagne MoMARDREAM-Naut. Le but était de mettre en évidence un

transfert de matière entre les symbiontes et l'hôte mais aussi d'identifier l'activité métabolique de ces symbiontes : (1), l'incorporation de BrdU (BromodésoxyUridine, analogue de base de l'ADN) permet d'analyser les communautés microbiennes actives car ce composé n'est incorporé que par les micro-organismes en division. Cela fait appel à des techniques d'immunologie et de microscopie pour révéler et observer le marquage. L'analyse de ces résultats est en cours à l'Université de Liège où j'ai pu me rendre grâce à une collaboration avec l'équipe de Morphologie Ultrastructurale. (2), l'incorporation de sources d'énergie et/ou de carbone sous forme de substrats carbonés marqués en ^{13}C - ou ^{14}C ou sous forme de molécule élémentaire (^3H -thymidine) permet par différentes techniques, de savoir quels sont les micro-organismes qui ont utilisé ces substrats et s'il y a eu transfert de matière vers l'hôte. Chacune des expériences de marquage isotopique a été réalisée en parallèle avec des spécimens de contrôle exposés à un cocktail d'antibiotiques (leurs différentes cibles permet d'élargir le spectre d'action) afin de tenter d'inhiber l'activité des micro-organismes associés à l'hôte, ce qui devait éliminer les possibilités de transfert actif entre les épibiontes et l'hôte.

L'analyse des résultats de ces expérimentations de marquage sont du domaine de la microscopie et de l'histochimie (analyse en cours à l'Université de Liège grâce à une collaboration) et de la biologie moléculaire (analyse en cours au sein du laboratoire à l'Ifremer de Brest). L'observation, la localisation et la quantification des micro-organismes ayant incorporé les composés est possible par microscopie électronique.

Les premiers résultats concernant le marquage à la BrdU montrent une très faible incorporation du composé dans la communauté microbienne intestinale pouvant être lié à un faible taux de croissance ou à une absence de division. L'identification phylogénétique des espèces ayant incorporé les substrats marqués sera réalisée en séparant les acides nucléiques en fonction de leur composition isotopique en carbone (^{12}C ou ^{13}C) sur gradient de densité (technique du SIP ou Stable Isotop Probing), suivi d'un séquençage. Les premiers résultats indiquent également une faible incorporation au sein de la communauté des épibiontes intestinaux. Les populations microbiennes actives ont été mises en évidence par RT-PCR (amplification de fragments ARN rétro-transcrits) au laboratoire. Quant au transfert de matière, il pourra être évalué par dosage de la teneur des différents isotopes du carbone ou de l'hydrogène en comparant des tissus d'hôtes témoins des conditions *in situ* et d'hôtes soumis à l'expérience d'incorporation. Ceci est en cours à l'Université de Liège grâce à la collaboration avec l'équipe de Morphologie Ultrastructurale.

4 - Approche culturelle : méthodologie de l'étude en laboratoire

La culture de micro-organismes est une approche complémentaire réalisée dans le but de cultiver et d'isoler des épibiontes de *R. exoculata*. J'ai mis au point et utilisé des techniques et des milieux de culture afin de cibler les métabolismes les plus probables parmi la communauté épibionte.

4.1 - Méthodologie de l'approche culturale

L'inoculation des milieux de culture - Les *inocula* sont réalisés à partir de broyats de pièces anatomiques de la crevette portant des épibiontes (branchiostégite, scaphognathite, tube digestif), de résidus de cheminée hydrothermale active et d'eau environnante. Les cultures réalisées à partir des échantillons collectés au cours de la campagne EXOMAR ont été inoculées avec des échantillons conservés à -80°C dans un mélange d'eau de mer synthétique (Sea salts *Sigma* 30 g/L) - DMSO (5 %). Les cultures réalisées à partir des échantillons collectés au cours des campagnes Serpentine, MoMARDREAM-Naut et MoMAR08 ont été inoculées avec un broyat d'échantillons frais (les crevettes ont été disséquées dès leur remontée), directement à bord du navire océanographique.

Les milieux de culture utilisés - Les échantillons sont mis en culture dans un milieu minéral simple afin de favoriser la croissance autotrophe, en microaérophilie ou aérobiose (*i.e.* à 2, 5, 10 ou 20 % d'oxygène) ou en anaérobiose, à l'obscurité et à température compatible avec l'environnement de *R. exoculata* (12 à 22°C).

Les micro-organismes ferro-oxydants (Fer II / O₂ ou Fer II / NO₃⁻) sont cultivés sur un milieu de Wolfe modifié (Modified Wolfe's Mineral Medium ou MWMM) dérivé de celui de Kucera et Wolfe pour la culture de *Gallionella* en 1992 (Kucera et Wolfe, 1957). Le milieu (**Tab.5**) est additionné de bicarbonate (20 mM final) en tant que source de carbone et de FeCl₂ en tant que donneur d'électrons (100 µM, 500 µM ou 1 mM).

Tab.5 - Composition du milieu de culture de base des micro-organismes ferro-oxydants (Kucera and Wolfe, 1957).

Base minérale MWMM		Vitamines de Wolin / Balch , 1 mL/L de MWMM	
Composé chimique	Quantité pour 1L d'eau MilliQ	Composé chimique	Quantité pour 1L d'eau MilliQ
NH ₄ Cl	1 g	biotine	2 mg
MgSO ₄ . H ₂ O	0,2 g	acide folique	2 mg
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,1 g	hydrochlorure de pyridoxine	10 mg
K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	0,05 g	thiamine	5 mg
Sea-salts (<i>Sigma</i>)	30 g	acide nicotinique	5 mg
Résazurine	< 0,5 mL/L	acide pantothénique	5 mg
		vitamine B12	0,1 mg
		acide ρ - aminobenzoïque	5 mg
		acide thioctique	5 mg

La culture des micro-organismes méthanotrophes (CH_4 / O_2) et méthylotrophes (méthanol, DMS ou méthylamines / O_2) est effectuée sur un milieu minéral ammonium nitrate (Ammonium Nitrate Mineral Salts ou ANMS) adapté de Whittenbury et al. (1970, **Tab.6**). L'atmosphère gazeuse des milieux de culture pour méthanotrophes est obtenue à l'aide d'un mélange de gaz à 1,5 bars $\text{CH}_4/\text{N}_2/\text{O}_2$ 50 :45 :5. L'atmosphère gazeuse des milieux de culture méthylotrophe est obtenue à l'aide d'un mélange de gaz à 1,5 bars N_2/O_2 90 :10 et le composé méthylé est ajouté à une concentration de 1% final.


Tab.6 - Composition du milieu de culture de base des micro-organismes méthanotrophes (Whittenbury et al 1970). Le milieu contient 2 mL/L de la solution de vitamines de Wollin/Balch décrite dans le tableau 5.

Base minérale ANMS		Éléments traces, 0.5 mL/L d'ANMS	
Composé chimique	Quantité pour 1L d'eau MilliQ	Composé chimique	Quantité pour 1L d'eau MilliQ
Sea-salts (<i>Sigma</i>)	30 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.2 g
KNO_3	0.25 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
NH_4Cl	0.25 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.4 g
KH_2PO_4	0.13 g	H_3BO_3	0.0015 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.13 g	CoCl_2	0.05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.4 g	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	0.25 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.1 g	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	500 μL	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
0.2 mg/mL	(0.0001 g)		

Les micro-organismes utilisant les sulfures sont cultivés sur ANMS additionné du soufre élémentaire et/ou de thiosulfate.

Les *Deferribacteres* représentant un groupe majoritaire dans la communauté épibionte du tractus digestif de *R. exoculata*, des cultures ont été mises au point à partir d'un milieu spécifique pour la culture des *Deferribacter* (**Tab.7**). Dans ce type de culture réalisée en anaérobiose, les *Deferribacter* étant des micro-organismes anaérobies stricts, la source de carbone et l'accepteur d'électrons sont organiques. Le donneur d'électrons est le soufre élémentaire. Une variante de ces cultures pour une approche innovante dont les composés chimiques présents se rapprochent des composés disponibles dans « l'écosystème *R. exoculata* » consiste à ajouter du fer ferrique. Il représente alors un second accepteur d'électrons et permet de cibler les micro-organismes ferro-réducteurs. Ces cultures ont été réalisées en présence et en absence de soufre.

Tab.7 - Composition du milieu pour la culture des *Deferribacter*.

935. DEFERRIBACTER MEDIUM			 Trace element solution		
NH ₄ Cl	0.33	g	Nitrilotriacetic acid	1.5	g
KCl	0.33	g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.33	g	MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0.5	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0.33	g	NaCl	1g	
KH ₂ PO ₄	0.33	g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.1	g
NaCl	25.00	g	CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0.18	g
Trace elements solu (see medium 141)	10.00	ml	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.1	g
Vitamin solution (see medium 141)	10.00	ml	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.18	g
KNO ₃	0.50	g	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.01	g
Yeast extract	0.15	g	KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0.02	g
NaHCO ₃	0.30	g	H ₃ BO ₃	0.01	g
Na-acetate	2.00	g	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.01	g
Sulfur, powdered	10.00	g	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025	g
Distilled water	1000.00	ml	Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0.3	mg
			Distilled water	1000	ml

Pour une approche innovante utilisant des composés chimiques présents et disponibles dans « l'écosystème *R. exoculata* », le couple accepteur/donneur d'électrons Fer III/CH₄ a été utilisé, en l'absence de soufre, avec une base minérale ANMS et 935.

[Les techniques de culture](#) - Tous les types de cultures sont réalisés selon la démarche suivante : les enrichissements sont réalisés en milieu liquide non agité en fioles pénicilline. Les isollements s'effectuent par dilutions en série en milieu liquide non agité en fioles pénicilline et en milieu solide sur boîtes de Pétri. La culture des micro-organismes ferro-oxydants est une exception. La disponibilité du fer ferreux étant complexe en présence d'oxygène à pH 7, j'ai mis au point une technique d'enrichissement en milieu semi-solide sur gradients opposés de fer II et oxygène (adaptée de Emerson et Moyer, 1997 ; Edwards et al., 2003 ; Emerson et Floyd, 2005).

Ces enrichissements sont réalisés dans des tubes (**Fig.36A-B**) contenant le substrat ferreux au fond et l'oxygène en surface. Le fer II et l'oxygène vont alors diffuser dans le milieu semi-solide en formant des gradients opposés. L'inoculation se fait sur toute la longueur du gradient. Ainsi, la croissance des micro-organismes aura lieu à l'endroit où les conditions sont les plus favorables. Un anneau de croissance microbienne est alors observé.

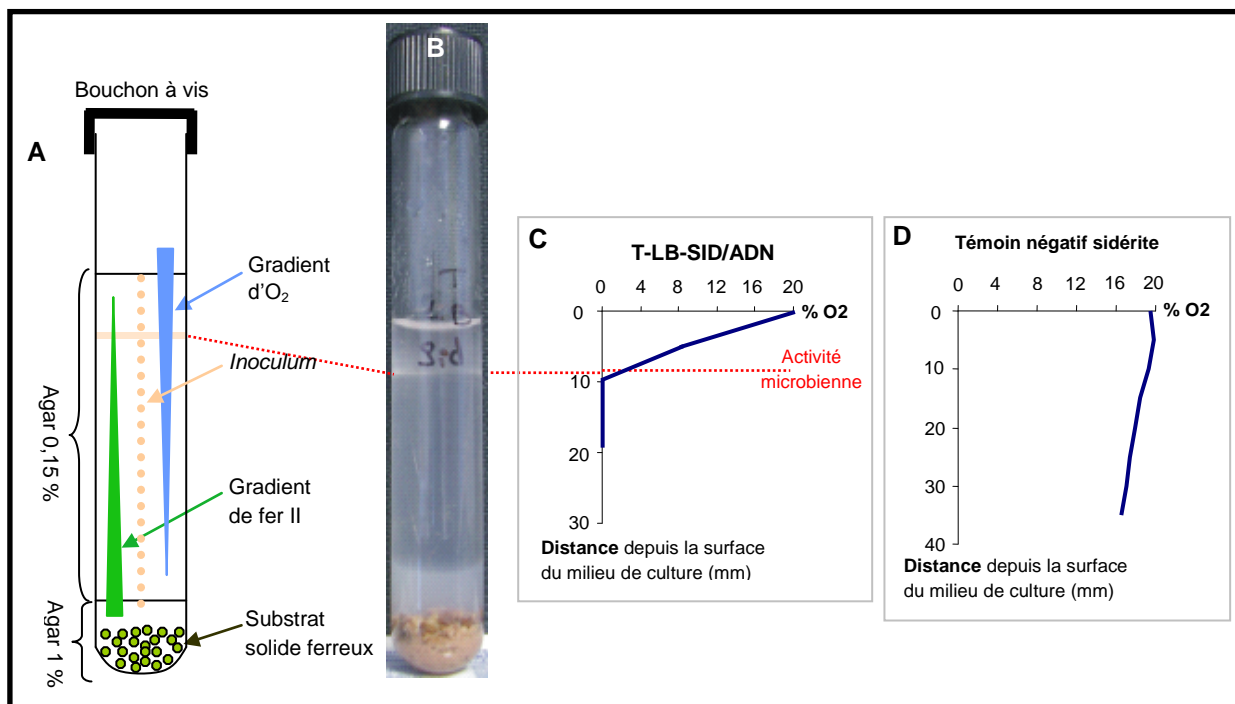


Fig.36 - Culture de micro-organismes ferro-oxydants en double gradient (A, schéma et B, photographie). Mesure de la teneur en oxygène dans une culture positive (C) et dans un témoin négatif (D).

La teneur optimale en O_2 a été déterminée à l'aide d'une microsonde à oxygène (**Fig.36C-D**) à l'Ifremer de Brest, en collaboration avec N. Le Bris, Laboratoire Environnements Profonds. Les mesures sur les cultures positives ont montré que l'optimum de croissance se situe à 2 ou 10 % d'oxygène selon les cultures. Elles ont également montré que l'oxygène, présent dans la totalité du milieu de culture non inoculé (**Fig.36D**), est consommé par les micro-organismes (**Fig.36C**). L'oxygénation optimale ayant été définie, les enrichissements ont par la suite été réalisés en milieu liquide en fioles avec différentes concentrations en fer II et sous une phase gazeuse dont la teneur en oxygène est adaptée. La culture en gradients opposés présente cependant certains inconvénients dont le principal est le manque de reproductivité du gradient de fer. Différentes sources de fer II ont été utilisées : ce sont des roches broyées telles que des sulfures de fer hydrothermaux bruts que j'ai au préalable identifiés par diffraction X en collaboration avec Y. Fouquet du laboratoire GM-LGM du département des géosciences de l'Ifremer de Brest (pyrite, sphalérite, isocubanite), du carbonate de fer brut (sidérite) ou de fer II soluble ($FeCl_2$). L'oxygénation optimale ayant été définie, les enrichissements ont par la suite été réalisés en milieu liquide en fioles avec différentes concentrations en fer II utilisé sous forme $FeCl_2$ afin de fixer le paramètre « disponibilité du fer II ».

4.2 - Résultats et discussion sur l'approche culturale

Plusieurs cultures positives ont été obtenues à partir d'échantillons des campagnes EXOMAR 2005, Serpentine 2007, MoMARDREAM-Naut 2007 et MoMAR08, principalement à partir de tapis bactériens de la cavité céphalothoracique. Les cultures à partir des tubes digestifs sont plus difficiles à obtenir, probablement du fait que la densité microbienne y soit plus faible. Le tractus digestif étant un environnement plus stable et aux conditions géochimiques distinctes des conditions environnementales, cela peut laisser supposer une dépendance forte à l'hôte, des micro-organismes associés.

Les premiers résultats montrent que les souches présentes dans les enrichissements sont affiliées à des groupes phylogénétiques ou à des espèces microbiennes qui ne sont pas majoritaires dans les banques de séquences de clones obtenues sur l'hôte tels que *Methylophaga* sp. (**Fig.37**) et les *Beta-* et *Deltaproteobacteria* (Zbinden et al., 2008 ; Durand et al., 2010). Ces bactéries sont probablement d'origine environnementale. Leur métabolisme pourrait être plus compétitif que celui des épibiontes dans les conditions de cultures définies dans cette étude. Cette approche a également permis de mettre en évidence une souche proche d'un clone d'épibionte du tractus digestif suite au travail de C. Jan au cours de son Master II. Cette souche, affiliée aux *Epsilonproteobacteria*, n'est pas encore disponible en population pure. Elle est actuellement en cours d'isolement au laboratoire. L'approche culturale permet aussi d'étudier plus aisément la structure et le métabolisme des souches obtenues, et ce même si ce ne sont pas des souches proches des épibiontes de la crevette. Le but étant de retrouver des fonctions métaboliques connues pour confirmer les hypothèses trophiques de l'écosystème hydrothermal dans lequel évolue *R. exoculata*, mais aussi d'identifier des fonctions métaboliques inconnues.

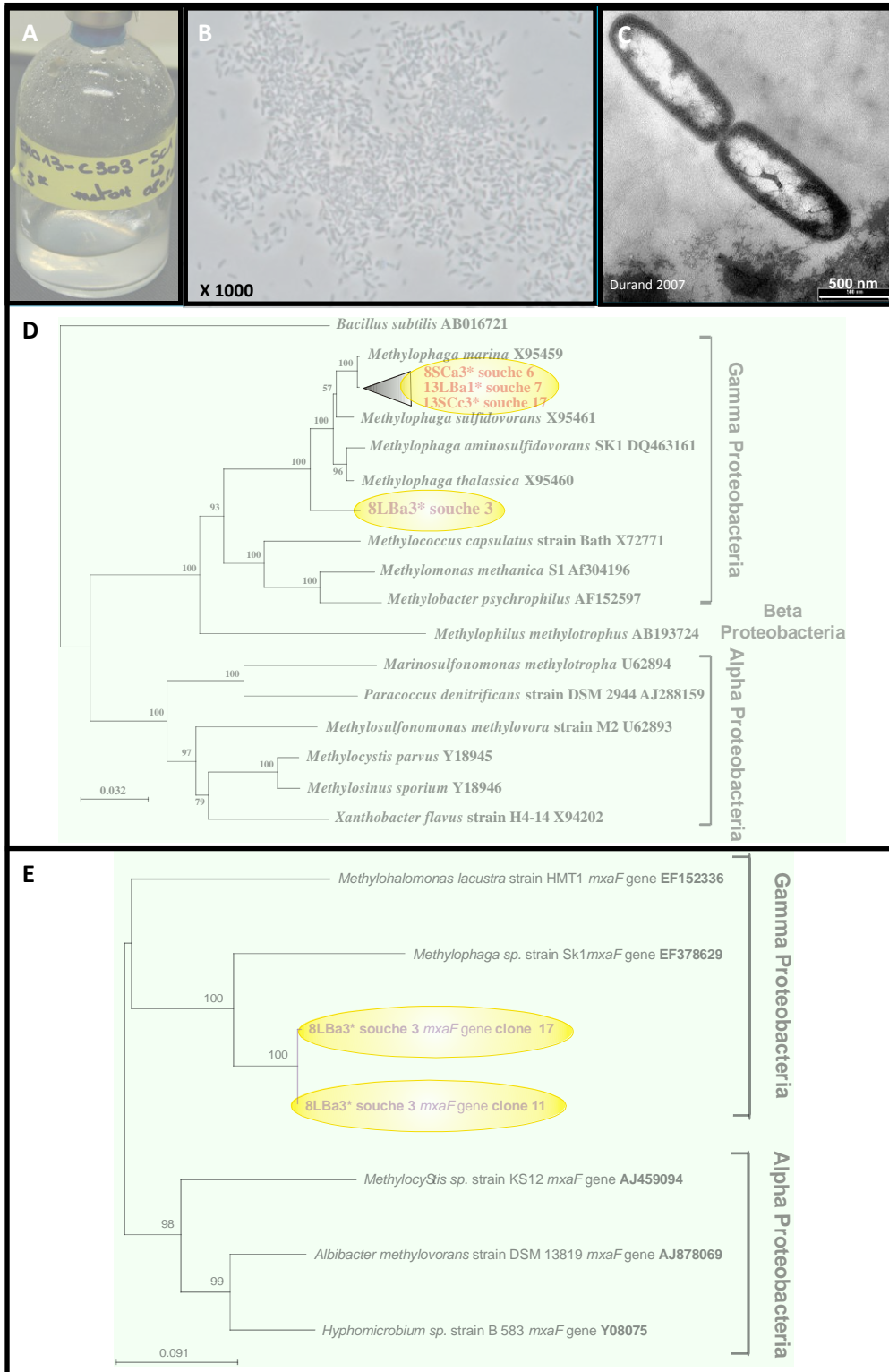


Fig.37 – Etude d’une souche méthylophilique : culture positive en milieu liquide (A) et observée en microscopie à contraste de phase (B). Arbres phylogénétiques des séquences d’ADNr 16S (C) et du gène *mxoF* (D) de souches méthylophiliques issues de cultures positives. Calculs en Neighbor-joining, avec l’algorithme de Kimura, sur la base de 500 bootstraps).

Le genre *Methylophaga* par exemple, est couramment présent dans les cultures de micro-organismes méthylophages. La plupart des souches obtenues sont très proches de *M. marina* et *M. thalassica* ou *M. sulfidovorans* (**Fig.37D**). Les travaux de Master I de M. Guri et d'IUT de T. Martin que j'ai encadré ont permis d'étudier certaines d'entre elles, issues de cultures sur méthanol. La présence du gène *mxoF* codant une sous-unité de la méthanol déshydrogénase chez les souches isolées affiliées aux *Methylophaga* a été mise en évidence. La position phylogénétique de la séquence du gène (**Fig.37E**), au sein des *Gammaproteobacteria Methylophaga*, est cohérente avec la position phylogénétique de la souche. Ces souches sont donc capables de réaliser l'oxydation du méthanol. Des observations en microscopie électronique à transmission confirment que ces bactéries sont dépourvues de membranes internes (**Fig.37C**).

En revanche, il est plus difficile d'isoler les souches de bactéries ferro-oxydantes. En effet, ce type de population vit en communauté simple ou complexe (une ou plusieurs morphologies) formant des agrégats épais (**Fig.38A-B**).

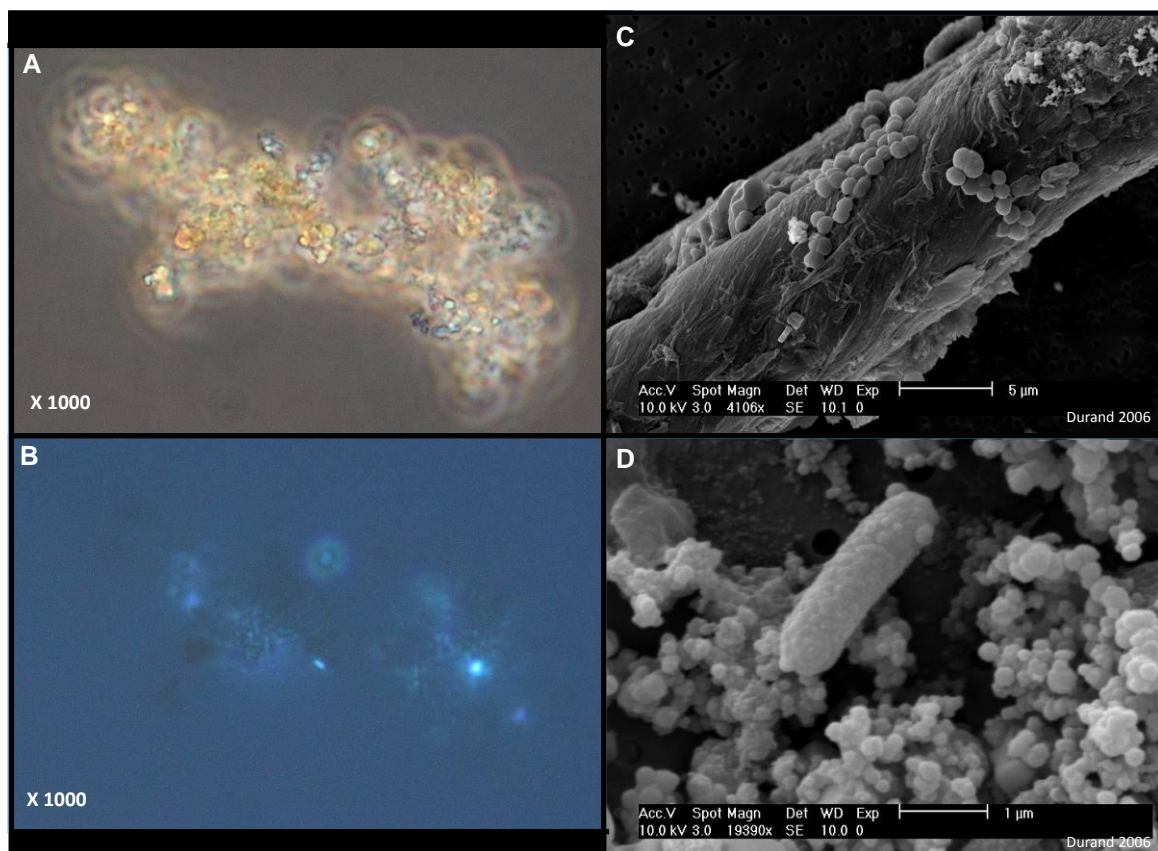


Fig.38 – Agglomérat de micro-organismes ferro-oxydants observé en microscopie à contraste de phase (**A**) et en épifluorescence (**B**, fixation DAPI) montrant les micro-organismes piégés dans une matrice avec des oxydes de fer. Microscopie électronique à balayage montrant des micro-organismes le long d'un filament probablement polysaccharidique d'origine microbienne (**D**) et un bacille dont la paroi présente des aspérités, dans des oxydes de fer (**E**).

Les micro-organismes sécrètent une matrice qui les piège avec les oxydes de fer (**Fig.38 A, B et E**) comme observé *in vivo* chez les épibiontes céphalothoraciques (Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a, 200b). Ils sont rarement présents sous forme libre en culture et ils sont difficiles à marquer à l'aide d'intercalants de l'ADN lors des observations microscopiques (**Fig.38A-B**).

L'amplification de leur ADN est également compliquée à mettre en œuvre. Outre le fer présent dans les cultures qui inhibe la polymérase, ces communautés n'atteignent pas de fortes densités en cultures de laboratoire. Elles se multiplient rapidement jusqu'à atteindre un pallier, de la même manière que des microorganismes formant des biofilms et qui ralentissent leur croissance une fois la structure arrivée à maturité grâce à une communication intercellulaire (Stoodley et al., 2002 ; Federle et Bassler, 2003 ; Henke et Bassler, 2004 ; Bassler et Losick, 2006). Il est donc possible que les communautés ferro-oxydantes régulent leur croissance par un mécanisme de type quorum sensing. *In situ*, les bactéries filamenteuses supposées ferro-oxydantes du céphalothorax de *R. exoculata* pourraient utiliser le même type de mécanisme pour la colonisation, et cela pourrait être un élément permettant d'expliquer le déclenchement des mues chez l'hôte, impliquant une communication bactérie-eucaryote (Shiner et al., 2005). Une collaboration avec K. Edwards (Institut océanographique de Woods Hole, Massachussets, USA) est prévue pour l'exploitation de ce type de culture.

4.3 - Bilan

Les cultures d'épibiontes restent donc un déficit majeur et la difficulté principale réside dans le fait que nous ne connaissons pas l'apport de l'hôte pour ses symbiontes. Non seulement l'hôte peut offrir un abri plus stable que le milieu extérieur, mais il peut aussi fournir certaines molécules indispensables pour la croissance des micro-organismes tels que certains acides aminés, vitamines... De plus l'hôte peut aussi exercer un contrôle de la division cellulaire qui pourrait perdurer même après la mise en culture. L'autre difficulté réside dans le fait que les bactéries libres de l'environnement sont en général plus promptes à répondre aux conditions de cultures en laboratoire (sur boîte ou en fiole, sur milieu synthétique). Ainsi il est d'autant plus difficile de cultiver les épibiontes car ces cultures en laboratoire favorisent toujours les micro-organismes présentant le plus court temps de latence et le plus fort taux de croissance.

Chapitre I

Diversité microbienne associée au tractus digestif des crustacés

Exemples de

Rimicaris exoculata (Crustacea : Decapoda)

et

Ventiella sulfuris (Crustacea : Amphipoda)

Rimicaris exoculata
(Crustacea : Decapoda)

CHAPITRE 1

DIVERSITE MICROBIENNE ASSOCIEE AU TRACTUS DIGESTIF DES CRUSTACES

1 - Exemple de *Rimicaris exoculata* (Crustacea : Decapoda): « Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community » Durand et al., 2009

1.1 - Introduction de l'étude

Etat de l'art - La crevette *Rimicaris exoculata* domine la macrofaune de plusieurs sites hydrothermaux actifs de la ride médio-Atlantique. Son comportement est curieux car elle semble gratter les parois des fumeurs actifs. Son contenu digestif est composé de sulfures et d'oxydes de fer. La présence de communautés microbiennes a été décrite au moyen d'approches microscopique (Van Dover et al., 1998 ; Segonzac et al., 1993 ; Casanova et al., 1993 ; Polz et Cavanaugh, 1995 ; Zbinden et al., 2004 ; Corbari et al., 2008a, 2008b) et moléculaire (Polz et Cavanaugh, 1995 ; Zbinden et al., 2008 ; Petersen et al., 2010) dans la cavité céphalothoracique, et a également été mise en évidence par approches moléculaires dans le tractus digestif (Polz et al., 1998 ; Zbinden et al., 2003). Bien qu'une interaction symbiotique et trophique soit suggérée, le rôle de ces communautés est encore hypothétique.

Méthodologie utilisée - Des expérimentations *in vivo* en incubateur pressurisé (IPOCAMP™) ont été réalisées : des crevettes provenant des sites Rainbow et TAG ont été soumises à des jeûnes dans le but d'éliminer naturellement tout le contenu du tractus digestif (bol alimentaire et micro-organismes allochtones). Les communautés microbiennes associées au tractus digestif des spécimens soumis aux jeûnes ont été comparées à celles des spécimens de référence dans le cadre d'une double approche moléculaire (banques de séquences de clones du gène de l'ARNr 16S) et microscopique (microscopie photonique, électronique à balayage et à transmission et hybridations *in situ* en fluorescence).

Résultats obtenus - Cette étude montre que le microbiote intestinal des crevettes des deux sites est principalement composé de *Deferribacteres*, de *Mollicutes*, d'*Epsilon*- et de *Gammaproteobacteria*. Pour la première fois, des filaments bactériens ont été observés, insérés entre les microvillosités des cellules épithéliales intestinales. Ils sont toujours présents dans les tubes

digestifs vidés après les périodes de jeûne ce qui suggère l'existence d'une communauté microbienne résidente. La composition des communautés microbiennes n'était pas dépendante du site, sauf pour les *Gammaproteobacteria* retrouvées uniquement chez les individus du site Rainbow. Une modification de la composition de la communauté épibionte des spécimens soumis à un jeûne prolongé est observée, passant d'une dominance des *Deferribacteres* à une dominance des *Gammaproteobacteria*. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une relation symbiotique entre *R. exoculata* et les épibiontes du tractus digestif.

Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community

Lucile Durand¹, Magali Zbinden², Valérie Cueff-Gauchard¹, Sébastien Duperron², Erwan G. Roussel¹, Bruce Shillito² & Marie-Anne Cambon-Bonavita¹

¹Ifremer, Centre de Brest, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, DEEP/LM2E, UMR 6197, Plouzané, France; and ²UMR CNRS 7138, Systématique, Adaptations et Evolution, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Correspondence: Marie-Anne Cambon-Bonavita, Ifremer, Centre de Brest, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, DEEP/LM2E, UMR 6197, BP 70, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 298 224 756; fax: +33 298 224 757; e-mail: macambon@ifremer.fr

Received 15 July 2009; revised 12 October 2009; accepted 20 October 2009.
Final version published online 27 November 2009.

DOI:10.1111/j.1574-6941.2009.00806.x

Editor: Julian Marchesi

Keywords

Deferribacteres; midgut epibiosis; *Mollicutes*; *Proteobacteria*; *Rimicaris exoculata*; starvation experiment.

Introduction

Gut microbial communities are rather ubiquitous both in vertebrates and in invertebrates. Symbioses between host and microorganisms range from pathogenic to mutualistic, facultative to obligate relationships. Gut microbiotas have been characterized for insects such as termites (Breznak, 1982; Chaffron & Von Mering, 2007), isopods such as *Porcellio scaber* (Wang *et al.*, 2004a,b, 2007) and other invertebrates (Harris, 1993). These gut-associated microbial communities play a major role in the metabolism of the host, in particular, in the case of low-level nutrient supply. Extreme environments such as deep-sea hydrothermal vents are oligotrophic and low oxygenated ecosystems enriched in numerous toxic compounds. Life under these conditions requires physiological adaptations of the fauna

Abstract

Rimicaris exoculata dominates the megafauna of several Mid-Atlantic Ridge hydrothermal sites. Its gut is full of sulphides and iron-oxide particles and harbours microbial communities. Although a trophic symbiosis has been suggested, their role remains unclear. *In vivo* starvation experiments in pressurized vessels were performed on shrimps from Rainbow and Trans-Atlantic Geotraverse sites in order to expel the transient gut contents. Microbial communities associated with the gut of starved and reference shrimps were compared using 16S rRNA gene libraries and microscopic observations (light, transmission and scanning electron microscopy and FISH analyses). We show that the gut microbiota of shrimps from both sites included mainly *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria*. For the first time, we have observed filamentous bacteria, inserted between microvilli of gut epithelial cells. They remained after starvation periods in empty guts, suggesting the occurrence of a resident microbial community. The bacterial community composition was the same regardless of the site, except for *Gammaproteobacteria* retrieved only in Rainbow specimens. We observed a shift in the composition of the microbiota of long-starved specimens, from the dominance of *Deferribacteres* to the dominance of *Gammaproteobacteria*. These results reinforce the hypothesis of a symbiotic relationship between *R. exoculata* and its gut epibionts.

to low levels of nutrients and toxic environments. In such ecosystems, life is based on chemosynthetic primary production and microbial–invertebrate associations are widespread (Dubilier *et al.*, 2008). Endosymbioses where bacteria are enclosed within bacteriocytes are well described in mussels such as *Bathymodiulus* spp. (Duperron *et al.*, 2007) or vestimentiferan worms such as *Riftia pachyptila* (Dubilier *et al.*, 1995), the latest even being deprived of an open digestive tract.

Rimicaris exoculata (Williams & Rona, 1986, *Crustacea*, *Decapoda*, *Alvinocarididae*) dominates the megafauna at several Mid-Atlantic Ridge (MAR) hydrothermal vent sites characterized by contrasted geochemical settings. End-member fluids from ultramafic-hosted sites, such as Rainbow, are usually enriched in methane (2.5 mM), hydrogen

(16 mM) and iron (24.05 mM), but relatively depleted in sulphides (1.2 mM), in contrast to basalt-hosted sites such as Trans-Atlantic Geotraverse (TAG, 0.124–0.147 mM CH₄, 0.15–0.37 mM H₂, 1.640 mM Fe, 6.7 mM H₂S; Charlou et al., 2002).

Rimicaris exoculata can form dense aggregates, of thousands individuals per square metre, living close to the active chimney walls, at temperatures between 10 and 20 °C (Segonzac et al., 1993; Zbinden et al., 2004; Copley et al., 2007; Schmidt et al., 2008). They seem to 'graze' the chimney walls, and are continuously in motion. *Rimicaris exoculata* has an enlarged gill chamber and hypertrophied mouthparts covered by thick microbial layers that could contribute to the shrimp nutrition and/or detoxification (Van Dover et al., 1988; Gebruk et al., 1993, 1997; Segonzac et al., 1993; Polz & Cavanaugh, 1995; Polz et al., 1998; Zbinden et al., 2004, 2008; Komai & Segonzac, 2008). Cephalothoracic epibionts of *R. exoculata* from Snake Pit were first affiliated to a single phylotype of *Epsilonproteobacteria* and assumed to be sulphide-oxidizers (Polz & Cavanaugh, 1995). In a recent study, shrimps from Rainbow displayed a broader diversity of epibionts that may indicate an adaptation to the different geochemical conditions prevailing at this site (Zbinden et al., 2008).

Earlier observations have shown that *R. exoculata* is neither a predator nor a scavenger. Although its gut seems to be functional (Casanova et al., 1993; Segonzac et al., 1993), the nutrition of this shrimp thus remains unclear. Three main nutrition strategies are currently suggested: (1) Microorganisms from the chimney walls and the environment could constitute the main nutritional source (Van Dover et al., 1988), although $\delta^{13}\text{C}$ analyses revealed that it was unlikely (Polz et al., 1998); (2) The gill chamber epibionts could be the host's main nutritional source, either by grazing on them (Casanova et al., 1993; Segonzac et al., 1993; Polz & Cavanaugh, 1995; Gebruk et al., 1997, 2000; Rieley et al., 1999) or by ingesting the bacteria and the exuviae after moult, or by transepidermal transfer of organic matter (Zbinden et al., 2004, 2008; Corbari et al., 2008); (3) Shrimps harbour a specific gut microbiota that could constitute an alternative nutritional source (Polz et al., 1998; Pond et al., 2000; Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003). In a previous study of shrimps from Rainbow, no intact microbial cell was detected in the stomach, and the digestive microbial communities displayed a low diversity at the phylum level with mainly *Epsilonproteobacteria* (1/2), *Entomoplasmatales* (1/4) and *Deferribacterales* (1/4) (Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003). However, as the gut was not empty, it was difficult to determine whether microbial communities were specific to the gut and/or ingested with minerals and surrounding seawater. Although the metabolisms and characteristics of these microbial communities are unknown, high carbon fixation rates have been measured in

the gut (Polz et al., 1998), suggesting they could be involved in nutrition and/or detoxification processes.

The present study describes and characterizes the composition of *R. exoculata* gut-associated microbial communities, using 16S rRNA gene sequence analysis and microscopic observations. Shrimps from two MAR sites (TAG and Rainbow), representing contrasted geochemical settings and depths, were compared in order to test the influence of the hydrothermal habitat over the microbial gut community. To investigate the presence of a resident microbial community, starvation experiments were performed, in order that shrimps completely expelled the bolus, by incubating live *R. exoculata* specimens for 8, 22 or 72 h in sterile seawater within a pressurized incubator (IPOCAMPTM, Shillito et al., 2001).

Materials and methods

Sample collection

Samples were obtained during the EXOMAR cruise in 2005 at the TAG (26°8'N–44°50'W, 3650 m depth) and Rainbow (36°14'N–33°54'W, 2320 m depth) hydrothermal vent sites on the MAR. Shrimps were collected using the slurp-gun of the ROV *Victor 6000*, operated from the RV *L'Atalante*. Before each dive, the bowls of the slurp-gun used for collecting the shrimps were aseptically washed with ethanol (96%) before being filled with sterile seawater. Once on board, live shrimps were either immediately dissected under sterile conditions and processed as reference samples or placed into the pressurized incubator. The specimens were of the same size and developmental stage (they were in the late ecdysis stage). For DNA analyses, the stomach (foregut) was discarded to keep only the intestine-associated microorganisms.

In vivo experiments

Live shrimps were incubated in a pressurized incubator (IPOCAMPTM). The stainless-steel vessel (approximately 19 L) is a flow-through pressure system (Shillito et al., 2001). Pressure oscillations arising from pump strokes (100 r.p.m.) were < 1 bar at working pressure. The temperature of the flowing filtered (0.4 µm) seawater was constantly measured and regulated, in the inlet and outlet lines (± 1 °C).

Less than 2 h after sampling, live and active animals were repressurized at *in situ* pressure: 230 bars at the Rainbow site and 300 bars at the TAG site (slightly less than the TAG *in situ* pressure, i.e. 360 bars, due to instrumental limitations). The average incubation temperature was 15 °C (Segonzac et al., 1993; Desbruyères et al., 2001; Zbinden et al., 2004; Schmidt et al., 2008). There were 20 shrimps per pressurized chamber. Previous *in vivo* experiments showed that the

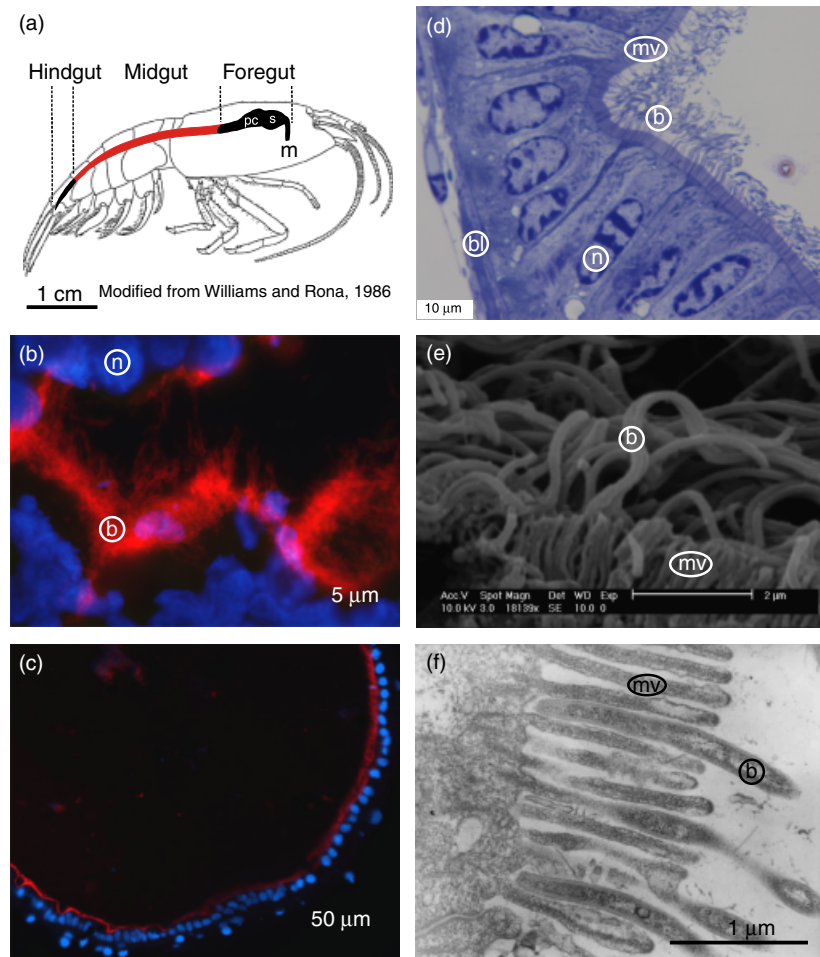


Fig. 1. Representation of *Rimicaris exoculata* digestive tract (a). Bacterial gut epibionts inserted between microvilli of the gut epithelium of a Rainbow long-starved shrimp observed in FISH (b, c), semi-thin section (d), SEM (e) and TEM (f). Hybridizations have been performed using the Eub338 Cy3-labelled probe (in red, Amann *et al.*, 1990) and DNA was stained with DAPI (in blue). m, mouth; pc, pyloric chamber; s, stomach. In circles: b, bacteria; mv, microvilli; n, nucleus; bl, basal lamina.

shrimps were under good physiological conditions when repressurized following this procedure (Ravaux *et al.*, 2003; Zbinden *et al.*, 2008). According to previous experiments, the specimens were starved in sterile seawater for 8, 22 or 72 h, to eliminate the bolus and associated microorganisms (Zbinden *et al.*, 2008). The 8-h starvation experiment was performed on Rainbow and TAG specimens, whereas the 22- and 72-h starvation experiments were only conducted for Rainbow shrimps. Live shrimps were dissected immediately after removal from the vessel and digestive tracts (Fig. 1a) were stored for DNA analyses (frozen at -80°C), FISH analyses and microscopic observations. No faeces could be collected in these experiments as they were completely dissolved in seawater.

16S rRNA gene sequence analysis

Phylogenetic analysis was performed on six *R. exoculata* gut clone libraries (Rainbow site: two intestines from pooled reference samples, one from 8-h-starved, one from 22-h-starved, one from 72-h-starved shrimps; TAG site: one from

reference sample, one from 8-h-starved shrimp) as follows: DNA was extracted on board on full-length intestines using the FastDNA[®] SPIN kit for soil (Qbiogen, Santa Ana, CA) following the manufacturer's instructions and kept at 4°C . Amplification of the bacterial 16S rRNA gene was performed with universal primers E8F/U1492R (respectively 5'-AGA GTTTGATCATGGCTCAG-3' and 5'-GTTACCTTGTTAC GACTT-3', 1484 bp, annealing temperature 49°C) or E338F/U1407R (respectively 5'-ACTCCTACGGGAGG CAGC-3' and 5'-GACGGGCGGTGWGTRCAA-3', 1069 bp, annealing temperature 54°C) and for Archaea with A24F/A1492R (respectively 5'-CGGTTGATCCTGCCGGA-3' and 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3', 1468 bp, annealing temperature 49°C). PCRs were performed using a GeneAmp[™] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Forster City, CA) under the following conditions: 3 min at 94°C , then 30 cycles including 1 min at 94°C , 1.5 min at the annealing temperature and 2 min at 72°C , and a final step of 6 min at 72°C . The PCR reaction mix (50 μL) was composed of $1 \times$ Taq buffer, 0.8 μM dNTP mix (Qbiogen), 10 pmol of each primer (Eurogentec, Liège, Belgium), 2.5 U

Taq polymerase (Qbiogen) and approximately 100 ng DNA template. PCR products were cloned using the TOPO[®] TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Positive clones were sequenced at the 'Plateforme Biogenouest' (Roscoff, France, <http://www.sb-roscoff.fr/SG/>) on an Abi prism[™] 3100 GA using the Big-Dye Terminator V3.1 chemistry (Applied Biosystems).

Sequences were analysed using the NCBI BLAST search program within the GenBank database (Altschul *et al.*, 1990). They were aligned using CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) and edited using SEAVIEW (Galtier *et al.*, 1996). Phylogenetic trees were constructed using PHYLO-WIN (Galtier *et al.*, 1996). The robustness of inferred topologies was tested using 500 bootstrap resampling of the trees (Felsenstein, 1985) calculated using the neighbour-joining algorithm (Saitou & Nei, 1987) with the Kimura two-parameter correction matrix. Sequences displaying over 98% similarity were considered to belong to a single phylotype [operation taxonomic unit (OTU)] and were clustered together. Only homologous positions were included in the final alignment.

Sequences were named as: R or T for Rainbow or TAG specimens, respectively, the number in the clone library, and R for reference shrimp, SW, S and LS for 8-, 22- and 72-h seawater starvation experiments, respectively. They are available from the European Molecular Biology Laboratory nucleotide sequence database under accession numbers FM863726–FM863780 and FM865857–FM865858.

For each library (one reference sample from TAG, two references pooled from Rainbow, one 8-h-starved shrimp from each TAG and Rainbow, one 22-h and one 72-h-starved specimens from Rainbow only), rarefaction curves were drawn using the RAREFAC program available online at <http://www.icbm.de/pmbio/downlist.htm>. The library clone coverage was estimated using the formula $[1 - (n1/N)]$ (Good, 1953), where $n1$ is the number of OTUs represented by only one clone and N is the total number of clones. The Shannon index was calculated using the formula

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i - [(S - 1)/2N]$$

where S is the number of OTUs, N is the total number of clones and p_i is the relative abundance of each OTU (calculated as the proportion of clones of a given OTU to the total number of clones in the community) (Shannon, 1948; Krebs, 1989).

FISH

In situ hybridization analyses were performed in order to study the distribution of phylotypes identified in the clone libraries. Samples ($n = 8$: one reference and one 8-h-starved shrimps from TAG; two references, one 8-h-starved, one 22-h-starved specimen and two 72-h-starved shrimps from

Rainbow) were fixed for 2 h in formaldehyde 3%–sterile seawater solution and rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) $2 \times$ –sterile seawater buffer (1:1). Samples were stored in absolute ethanol-PBS $2 \times$ solution (1:1) at -20°C until use. Samples were embedded in polyethylene glycol distearate-1-hexadecanol (9:1) blocks (Sigma, St. Louis, MO) after being dehydrated and soaked (water–ethanol and ethanol–resin series at 37°C) (Duperron *et al.*, 2007). Blocks were cut into 6–10- μm sections using an RM 2165 microtome (Reichert-Jung, Germany). Resin was eliminated in ethanol and rehydrated sections were hybridized in a reaction mix containing 0.5 μM of each probe in a 10%, 20%, 30% or 40% formamide hybridization buffer [0.9 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.01% sodium dodecyl sulphate (SDS), 10%, 20%, 30% or 40% deionized formamide; see Table 1] and hybridized for 3 h at 46°C . Sections were washed at 48°C for 15 min in a washing buffer (respectively 0.450, 0.215, 0.102 or 0.046 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.005 M EDTA, 0.01% SDS) and rinsed briefly. Sections were covered with Slow Fade[®] Gold antifade reagent containing 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen), and a cover slip. The universal probes (Eurogentec) were Eub338 (targeting most of the Eubacteria, Amann *et al.*, 1990), Arch915 (targeting Archaea, Stahl & Amann, 1991), GAM42a (targeting *Gammaproteobacteria*, Manz *et al.*, 1992) and EPSY549 (targeting *Epsilonproteobacteria*, Lin *et al.*, 2006). New probes were also designed according to our gut clone sequences: Molli352 (targeting gut-associated *Mollicutes* of *R. exoculata*, modified from Wang *et al.*, 2004a), Def576 (targeting gut-associated *Deferribacteres* of *R. exoculata*, modified from Kumaraswamy *et al.*, 2005), clo4/Epsi653 and clo15/Epsi653 (targeting gut-associated *Epsilonproteobacteria* of *R. exoculata*, modified from Polz & Cavanaugh, 1995) and LBI32/130 (targeting *R. exoculata* cephalothorax methanotrophic *Gammaproteobacteria*, modified from Duperron *et al.*, 2008) (Table 1). Each probe was used on every sample. Observations were performed on 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). Micrographs were analysed using the QCAPTURE PRO program (Qimaging).

Light and electron microscopic observations

Samples for light microscopy (LM, $n = 3$ digestive tracts: Rainbow reference, 22-h-starved and 72-h-starved shrimps), scanning electron microscopy (SEM, $n = 5$: Rainbow reference, 8-h-starved and 72-h-starved shrimps and two TAG reference shrimps) and transmission electron microscopy (TEM, $n = 4$: Rainbow reference, 8-h-starved and 72-h-starved shrimps and TAG reference shrimp) microscopic

Table 1. Fluorescent probes used in this study

Phylotype	Probe	Probe sequence (5'-3')	Fluorescent dye	Position (rRNA genes)	% Formamide	References
Archaea	Arch915	GTGCTCCCGCCAAATTCCT	Cy3	915 (16S)	10-20-30	Stahl & Amann (1991)
Eubacteria	Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Cy3 or Cy5 or ATTO488	338 (16S)	10-20-30-40	Amann et al. (1990)
<i>Molluscus R. exoculata</i> gut clones	Mollic352	GTGAAAATTCTTACTGCTG	Cy3 or ATTO488	352 (16S)	10-20-30-40	This study
<i>Deferribacteres R. exoculata</i> gut clones	Def576	CACTGACTTGACAAACCT	Cy3	576 (16S)	10-20-30-40	This study
<i>Epsilonproteobacteria</i>	EPSY549	CAGTGATTCGAGTAACG	Cy3	549 (16S)	20-30	Lin et al. (2006)
<i>Epsilonproteobacteria R. exoculata</i> gut clones	clo4/Epsi653	ATCTCCCTCCAGACTCT	Cy3	653 (16S)	10-20-30-40	This study
<i>Epsilonproteobacteria R. exoculata</i> gut clones	clo15/Epsi653	ATCTCTCTCCCTCACTCT	Cy5 or ATTO488	653 (16S)	10-20-30-40	This study
<i>Gammaproteobacteria</i>	GAM42a	GCCTTCCACATCGTTT	Cy3	1027 (23S)	20-30	Manz et al. (1992)
Methanotrophic <i>Gammaproteobacteria R. exoculata</i> cephalothoracic clones	LB132/130	TCCTGGCTATCCCCACTAC	ATTO488	130 (16S)	10-20-30	This study

observations were fixed for 16 h in 2.5% glutaraldehyde-sterile seawater solution and stored at 4 °C in a NaN₃-sterile seawater buffer (Sigma, final concentration 6.7 mM). Samples for SEM were then dehydrated by ethanol series and desiccated with hexamethyldisilazane (Sigma) for 45 min and 5 h in a critical-point dryer CPD 020 (Balzers union, Balzers, Liechtenstein). The digestive tracts cut longitudinally were displayed on a specimen stub, before desiccation, and gold-coated with an SCD 040 (Balzers union). Observations were performed using a Quanta 200 MK microscope (FEI, Hillsboro, OR) and the SCANDIUM acquisition program (Soft Imaging System, Munster, Germany). For LM and TEM observations, samples were postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol and polypropylene oxide series before they were embedded in an epoxy resin (Serlabo, Paris, France). Semi-thin (800 nm) and ultrathin (50–75 nm) sections were cut with an ultramicrotome Ultracut E (Reichert-Jung) using a diamond knife. Semi-thin sections were stained with toluidine blue for observations by LM (Nikon Optiphot-pol microscope and Zeiss Opton photomicroscope). Ultrathin sections were displayed on copper grids and contrasted with uranium acetate and lead citrate. Observations were carried out on a Philips 201 electron microscope, operating at 80 kV.

Results and discussion

In vivo experiments and sample considerations

The shrimps analysed were actively swimming before, during and after the incubation experiments. 16S rRNA genes were successfully amplified and cloned from the total DNA extracted from the midgut and the hindgut (Fig. 1a). Semi-thin sections and macroscopic observations of the digestive tracts indicated that the 8- or 22-h starvation incubations were not long enough to completely expel the bolus, as all the guts observed were still full of minerals (Supporting Information, Fig. S2a). However, after the 72-h starvation experiment, the guts were empty. In order to identify a possible resident microbial community, the gut microbial composition of reference shrimps (TAG and Rainbow) and animals incubated for 8 and 22 h was therefore compared with 72-h-starved shrimps.

Microscopic observations of the *R. exoculata* gut anatomy

The anatomy of the *R. exoculata* digestive tract showed a shorter foregut (mouth, stomach and pyloric chamber) and hindgut (Fig. 1a) compared with other crustaceans (Komai & Segonzac, 2008). The gastric mill usually has a crushing function. The microscopic observations showed that spicules and setae on the stomach wall of *R. exoculata* were less

abundant than for scavenger hydrothermal shrimps such as *Chorocaris chacei* and *Mirocaris fortunata* (data not shown). *Rimicaris exoculata* had more developed setae at the beginning of the pyloric chamber than *C. chacei* and *M. fortunata*. This suggests that *R. exoculata* may have a low mechanical digestive activity.

The midgut of *R. exoculata*, the central digestive absorption zone deprived of a cuticle, represented two-thirds of its total gut length, while it represents only between one sixth and one third of the total gut length in most crustaceans (Milne-Edwards, 1840). Cross-sections of *R. exoculata* midgut also revealed large exchange surfaces for all specimens (reference and starved animals), as the epithelium displayed numerous invaginations and cells with dense microvilli. These cells were typical active digestive cells, with large nuclei (Fig. 1d) and many mitochondria (MET observations, Fig. S2c). The microscopic observations of the bolus revealed that it was mainly composed of organic matter (few cuticle fragments and probably degraded microorganisms) and minerals (Fig. S2a; no total organic matter analysis of the bolus was performed), which may also suggest a seawater intake activity.

Microscopic observations of the microbial communities

In LM, SEM and TEM observations, the numerous mineral particles representing most of the bolus made the detection of microorganisms difficult. All our observations of the bolus have shown rare disc-shaped bacteria, which are reported on the vent chimney walls (Van Dover *et al.*, 1988) and in the gill chamber (Polz & Cavanaugh, 1995; Zbinden *et al.*, 2004). These rare disc-shaped cells were intact, apparently not subjected to rapid digestion. In a previous work, it was shown that the cephalothoracic filamentous mat was not scraped (Zbinden *et al.*, 2004; Corbari *et al.*, 2008). Moreover, the seawater flow in the gill chamber enters the chamber towards the gills and exits bathing the filamentous epibiotic bacteria (Casanova *et al.*, 1993; Zbinden *et al.*, 2004). Hence, the seawater flow is at the opposite of the mouth, which probably does not allow epibiont ingestion. The observation of microbial cells associated with the bolus was easier using fluorescence microscopy. A positive signal using the Eub338 probe (Eubacteria-specific) revealed the bacterial cells within the bolus (single rods or rods in small aggregates, cocci and rare disc-shaped cells). Part of the rods and a few cocci were detected using the *Gammaproteobacteria*-specific probe Gam42a. A few cocci hybridized using the LBI32/130 probe (data not shown). This probe was designed to target methanotrophic *Gammaproteobacteria* associated with *R. exoculata* gill chamber epibionts (Zbinden *et al.*, 2008). A few rods and all disc-shaped bacteria successfully hybridized

using the *Epsilonproteobacteria*-specific probe EPSY549. These rods were also positively labelled using the two *R. exoculata* gut clones-specific probes clo4/Epsi653 and clo15/Epsi653. The rod-shaped bacteria in small aggregates successfully hybridized using the *Deferribacteres*-specific probe Def576 (Fig. S2d and e). A few *Deferribacteres* were also retrieved associated with the bolus along the entire gut, regardless of the site. No signal was ever obtained using the Molli352 probe on the gut content.

In the midgut, the microscopic observations showed numerous long (up to 15 µm) and thin (0.2–0.3 µm) filaments, corresponding to individual cells without any visible septum, inserted between the microvilli of the epithelial gut cells (Fig. 1d–f). These filamentous bacteria were observed in dense populations within the gut of all specimens (Fig. 1b–e), with no visible difference in their distribution and abundance, regardless of the collection site and starvation treatment. *In situ* hybridizations using the Eubacteria-specific probe Eub338 indicated that all these filaments were active bacteria (Fig. 1b and c). No *Deferribacteres* were observed associated with the gut epithelium. No clear *in situ* hybridization signals were obtained from the filaments using *Gammaproteobacteria*-specific probes (listed in Table 1) or using the Molli352 probe. A weak positive signal was observed from these epithelium-associated communities using the *Epsilonproteobacteria*-specific probe EPSY549, even after the 72-h starvation experiment. These bacterial communities were clearly separated from the bolus by the peritrophic membrane (Fig. S2b), a natural barrier that preserves the gut epithelium of arthropods from mechanical abrasion and microbial infections (Mercer & Day, 1952; Brandt *et al.*, 1978). The filamentous morphology of these bacteria associated with the large surfaces they occupy, thanks to the numerous invaginations of the gut epithelium, yields a large exchange surface between microbial communities and their environment. As the midgut is not subject to exuviation, this probably favours long-term microbial colonization and interactions of a resident microbial community with its host.

This community may play a significant role in the detoxification of compounds present in the bolus, such as minerals or heavy metals. Detoxification has been described for *Limnoria tripunctata*, a wood-boring marine isopod (Zachary & Colwell, 1979; Zachary *et al.*, 1983). The resident gut microbiota of *L. tripunctata* was only observed in specimens inhabiting creosote-treated wood, but it was absent if reared on nontreated wood. Therefore, it suggested that these gut microbial communities could contribute to the creosote resistance of the isopod. Analogously, as the *L. tripunctata* bacterial community was also in close association with the intestinal epithelium within the peritrophic space, the *R. exoculata* gut microbial communities might participate in mineral/metal detoxification.

Archaeal communities of the gut

The composition of archaeal communities from the gut of reference and starved *R. exoculata* at the TAG and Rainbow sites was investigated using 16S rRNA gene clone libraries (detailed in Tables 2, 3 and S1). The archaeal sequences from the gut of TAG shrimps (34) were affiliated to the *Euryarchaeota* lineages DHVE 2 (deep-sea hydrothermal vent *Euryarchaeota*, 23), *Thermococcales* (6) and to *Crenarchaeota* Marine Group I (5). In contrast, all archaeal-related clone sequences from the gut of Rainbow shrimps (39) were affiliated to *Methanococcales*. Although these archaeal lineages are usually found at hydrothermal vents (e.g. Takai & Horikoshi, 1999; Reysenbach *et al.*, 2000; Nercessian *et al.*, 2003, 2005; Schrenk *et al.*, 2003; Roussel & Cambon-Bonavita, unpublished data), the TAG and the Rainbow gut-associated archaeal populations were clearly different, probably due to the contrasted geochemical conditions characterizing both sites. Interestingly, no archaeal cells were ever detected using *in situ* hybridization with the general Archaea-specific probe Arch915 (Stahl & Amann, 1991), whatever the condition used (Table 1), and no archaeal sequences were retrieved after long starvation incubations. These results suggest that these archaeal communities were probably rare and/or not active. Therefore, they probably do not belong to the gut microbiota, but more likely have been ingested with chimney particles and fluids.

The gut bacterial distribution and composition

Six bacterial 16S rRNA gene clone libraries were constructed (Table 2), representing a total of 376 clone sequences from reference shrimps (154) and from starved shrimps (222). Although the analysis of clone libraries is only partially quantitative, as the sampling methods and molecular techniques introduce biases (e.g. Bent & Forney, 2008; Quince *et al.*, 2008), the phylogenetic diversity of the

microbial communities associated with *R. exoculata* midgut for each starvation incubation time can be compared, although caution is needed. As the number of clones per sample was low, rarefaction analyses were conducted for each library. Results indicated that clone libraries adequately represented the composition of the communities in the gut contents (see Fig. S1 for rarefaction curves), because curves reached a plateau for the number of clones investigated. The clone coverage was satisfactory for the six clone libraries: 92% for Rainbow and TAG reference shrimps, 96% for the Rainbow 8-h-starved specimen, 97% for the TAG 8-h-starved specimen, 95% for the 22-h-starved shrimp and 94% for the 72-h-starved shrimp. On average, the six 16S rRNA gene bacterial clone libraries were mostly dominated by four phyla affiliated to *Deferribacteres* (63%), *Mollicutes* (12%), *Gammaproteobacteria* (10%) and *Epsilonproteobacteria* (9%). Although sequences affiliated with *Firmicutes*, *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* (CFB), *Verrucomicrobiae*, *Delta-* and *Betaproteobacteria* were also detected, they represented a small fraction of the clones (6%). The overall bacterial communities' composition, detailed in Tables 2 and S1, was consistent with a previous molecular analysis of the *R. exoculata* gut (Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003). Clone libraries from the Rainbow and TAG reference shrimps showed a similar bacterial community composition. In both, the clones were mainly related to *Deferribacteres* (75%), *Mollicutes* (10%), *Epsilonproteobacteria* (6%), *Gammaproteobacteria* (3%) and other groups (CFB and *Firmicutes*, 6%). The compositions of gut bacterial clone libraries after the 8-h starvation experiment (on both sites) and the 22-h starvation incubation (on Rainbow site) were also similar and still dominated by *Deferribacteres* (81% and 96%, respectively). In contrast, the 72-h starvation clone library was dominated by *Gammaproteobacteria* (40%), *Mollicutes* (23%), *Epsilonproteobacteria* (23%) and other minor lineages (11%), whereas

Table 2. Distribution of the bacterial 16S rRNA gene clones from Rainbow and TAG reference and starved shrimps. The main phylogenetic group per sample is shown in bold

Phylogenetic groups	Number of clones						
	Reference samples		Starvation 8 h		Starvation 22 h Rainbow	Starvation 72 h Rainbow	Total
	Rainbow (two guts)	TAG	Rainbow	TAG			
<i>Deferribacteres</i>	51	65	43	32	45	2	238
<i>Mollicutes</i>	10	5	1	9	0	19	44
<i>Gammaproteobacteria</i>	4	0	0	0	0	33	37
<i>Epsilonproteobacteria</i>	7	2	3	0	2	19	33
<i>Betaproteobacteria</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Deltaproteobacteria</i>	0	0	1	0	0	0	1
CFB	2	1	2	1	0	0	6
<i>Firmicutes</i>	1	1	0	1	0	8	11
<i>Verrucomicrobiae</i>	0	5	0	0	0	0	5
Total	75	79	50	43	47	82	376

Table 3. Closest match of representative 16S rRNA gene clone sequences

Phylogenetic group	Representative clone sequences	Hit of BLAST (accession no.)	Similarity (%)	No. of clones
Bacteria				
<i>Deferribacteres</i>	R36S, R28SW, R82R	<i>R. exoculata</i> gut clone 62 (AJ515723)	99	238
<i>Gammaproteobacteria</i>	R67LS	Endosymbiont of <i>Alviniconcha</i> sp. type 1 clone SyA1-P1 (AB235235)	95	4
	R57LS	<i>Pseudomonas entomophila</i> strain L48 (CT573326)	98	1
	R32R	<i>R. exoculata</i> gill chamber clone LBI32 (AM412518)	96	4
	R48LS	Gammaproteobacterium clone Belgica2005/10-ZG-8 (DQ351804)	93	2
	R53LS	<i>Alteromonas</i> sp. strain SHY1-1 (AB078014)	99	3
	R16LS	Zebrafish gut clone aab28h07 (DQ819366)	99	11
	R68LS	Iron-reducing enrichment clone CI-A2 (DQ676994)	99	1
	R56LS	<i>Photobacterium phosphoreum</i> strain RHE-01 (AY435156)	98	9
	R19LS	Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. Ac309 (AY549549)	98	1
	<i>Epsilonproteobacteria</i>	R3R, R30LS	Hydrothermal vent gastropod clone SF_C23-F4 (AY531582)	98–97
R62LS		Hydrothermal vent gastropod clone SF_C23-C8_shell (AY531600)	96	2
R69LS		<i>R. exoculata</i> gut clone 4 (AJ515714)	99	12
<i>Mollicutes</i>	R28R, R23LS	<i>R. exoculata</i> gut clone 11 (AJ515717)	99	13
	R67SW, R2R	<i>R. exoculata</i> gut clone 42 (AJ515720)	99	24
	T8SW	<i>R. exoculata</i> gut clone 69 (AJ515722)	99	16
<i>Firmicutes</i>	T28SW	<i>Gillichthys mirabilis</i> gut clone C13 (DQ340200)	86	4
	T17R	Mammals gut clone Saki_aaj62c07 (EU461853)	87	1
	R8R, R2LS, T17SW, R26LS	<i>Gillichthys mirabilis</i> gut clone C13 (DQ340200)	81–91	8
<i>CFB</i>	R5LS	' <i>Candidatus Bacilloplasma</i> ' isopod gut clone P10 (DQ485976)	80	2
	R21R, R21SW, R39SW	Arctic sediment clone SS1_B_01_16 (EU050905)	94–97	4
	T70R	Hydrothermal sediments clone p816_b_3.23 (AB305587)	92	1
<i>Verrucomicrobiae</i>	R14R	<i>Bacteroidetes</i> clone C319a-R8C-D4 (AY678514)	94	1
	T72R	Hydrothermal <i>Verrucomicrobia</i> clone pltb-vmat-33 (AB294943)	87	1
	T20R	<i>Paralvinella palmiformis</i> clone P. palm C 136 (AJ441224)	92–96	4
<i>Betaproteobacteria</i>	R64LS	<i>Ralstonia</i> sp. clone EMP_AD31 (EU794311)	99	1
<i>Deltaproteobacteria</i>	R65SW	<i>Geothermobacter</i> sp. Fe30-MC-S (AB268315)	93	1
Archaea				
<i>Methanococcales</i>	R5R	<i>Methanococcus aeolicus</i> strain Nankai-3 (DQ195164)	97	39
DHVE 2	T48R, T4R	Hydrothermal clone met43 (DQ082955)	93–98	23
<i>Thermococcales</i>	T38	<i>Thermococcus siculi</i> strain DSM 12349 (AY099185)	99	6
Marine group 1	T24R	Hydrothermal clone pEPR624 (AF526982)	99	5

the *Deferribacteres* represented < 3% of the sequences (Tables 2 and S1).

All sequences affiliated to the *Deferribacteres* phylum (238) represented a single phylotype previously detected from *R. exoculata* gut (Table S1 and Fig. 2a; *R. exoculata* gut clone 62 and 91, Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003). To date, the *R. exoculata* gut clone-related genera, i.e. *Mucispirillum* and *Geovibrio*, have only been detected from gut microbiota, sediments and oil reservoirs and were never reported from hydrothermal vents, suggesting that this phylotype could be specific to *R. exoculata*. Moreover, the high similarity level between all *Deferribacteres*-related sequences (> 99%) associated with shrimps, regardless of the site, suggests a long-term, specific association between these bacteria and their host. Hence, the *Deferribacteres* from this cluster probably are part of *R. exoculata*-specific gut microbial community. The difference in the proportion of *Deferribacteres*-related sequences between the 72-h-starved specimen clone library (< 3%) and all the other clone libraries

(at least 70%) may be explained by several hypotheses: (1) *Deferribacteres* could have been free-living in the gut (not attached to the gut wall) and eliminated with the bolus after the 72-h starvation experiment. (2) Some *Deferribacteres* use iron and sulphides as energy sources (Miroshnichenko *et al.*, 2003), and therefore would not survive if deprived of these compounds during long starvation periods. (3) Some *Deferribacteres* are heterotrophic bacteria, therefore using organic matter of the bolus, such as ingested microorganisms or cuticle fragments. (4) All *Deferribacteres* known so far are strict anaerobes. During the starvation experiment, the reduced minerals are evacuated with the bolus. The gut is then probably under aerobic conditions, which could impair the *Deferribacteres* growth and maintenance.

Sequences related to *Mollicutes* also represented a significant proportion of the clone libraries (13% from reference shrimps) and this even after a 72-h starvation experiment (23%, Fig. 2b and Table 2). Three clusters were identified

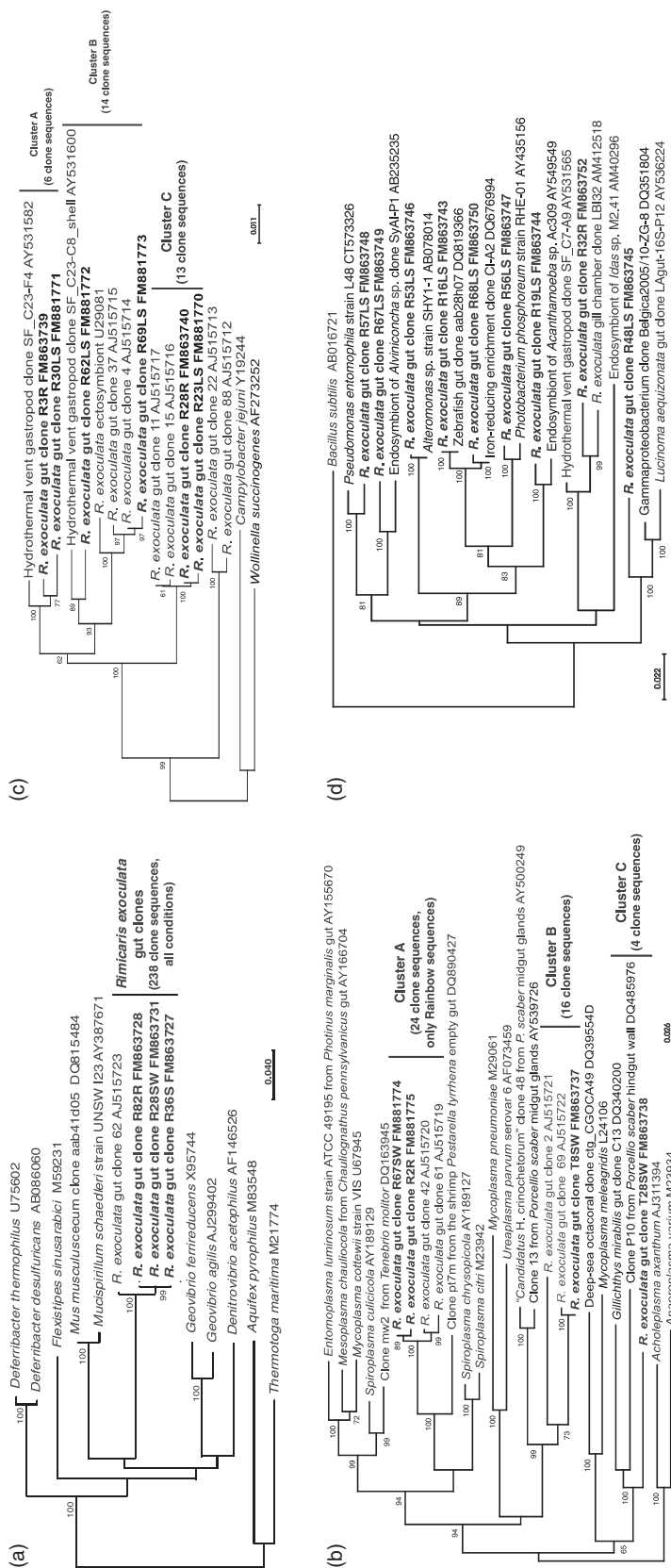


Fig. 2. Phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences from the digestive tract of reference and starved *Rimicaris exoculata* from TAG and Rainbow hydrothermal sites. They represent the main bacterial phylogenetic groups of microorganisms associated with the shrimp gut: *Deferribacteres* (a, calculated on 882 bp), *Mollicutes* (b, calculated on 796 bp), *Epsilonproteobacteria* (c, calculated on 841 bp) and *Gammaproteobacteria* (d, calculated on 842 bp). The robustness was tested using 500 bootstrap resampling of the trees calculated using the neighbour-joining algorithm with the Kimura two-parameter correction matrix. Sequences were named as: R or T for Rainbow or TAG specimens, respectively, the number in the clone library, and R for reference shrimp, SW, S and LS for an 8-, 22- and 72-h seawater starvation experiments, respectively. Our clones are shown in bold.

and affiliated to *Entomoplasmatales* and *Mycoplasmatales*. Clusters B and C were detected in specimens from both TAG and Rainbow sites, and after all starvation experiments (Table S1), suggesting that they were not a site-specific community and so reinforcing the hypothesis of a specific symbiotic relationship. *Entomoplasmatales* and *Mycoplasmatales* bacteria are usually heterotrophic pathogens, commensals or symbiotic bacteria associated with vertebrates (mammals or fishes), insects, crustaceans or plants (Razin, 1978, 1998; Clark, 1984; Regassa & Gasparich, 2006). The cluster A (24 sequences, Fig. 2b) was closely related to a sequence detected from a starved Mediterranean shrimp (98% similarity), *Pestarella tyrrhena*, suggesting that *Mollicutes* are ubiquitous of crustaceans' gut and so could also be part of the resident digestive tract microbiota. The cluster A-affiliated sequences were retrieved only in Rainbow specimens (Table S1). This microbial population could be site-dependant or this could be due to the number of sequences analysed. The cluster B (16 sequences, Fig. 2b) was closely related to *R. exoculata* gut clones within the *Mycoplasmatales* order (99% similarity; Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003). Cluster C (four sequences, Fig. 2b) was affiliated to epibiotic phylotypes from crustaceans (isopods) and fish guts, suggesting they could also represent resident microbial phylotypes. Interestingly, all the *R. exoculata* gut sequences related to *Mollicutes* were affiliated to epibionts from other crustaceans such as *P. scaber*, which harbours long or spherical stalked microorganisms inserted between the microvilli of midgut glands (Wang *et al.*, 2004a, 2007). Although microscopic observations showed that the morphology and size of *R. exoculata* gut epibionts (long thin filamentous single cells) were similar to some *Spiroplasma* (long thin bacteria, 0.1–0.35 µm diameter, up to 5 µm length, Garnier *et al.*, 1981), suggesting they could be *Mollicutes* (Fig. 1b–f), no clear *in situ* hybridization signal was ever detected using the *Mollicutes*-specific probe for each stringency condition and sample tested (Table 1). However, Wang *et al.* (2004a) reported a very low hybridization signal on the *Mollicutes* symbionts of the midgut glands of *P. scaber*. Moreover, as even the DAPI staining of the filaments was difficult to observe, the very low *Mollicutes* hybridization signals could also be due to the size of these very thin bacteria (~0.3 µm diameter). *Mollicutes* are polymorphic microorganisms (spheroid, filamentous, ramified, helicoïdal) characterized by an absence of a cell wall, and therefore poorly resistant to extreme environments. Usually, *Mollicutes* have a reduced genome and depend on host nutrients (Maniloff & Morowitz, 1972; Razin, 1978, 1998; Clark, 1984; Regassa & Gasparich, 2006). The midgut of *R. exoculata* does not moult and is relatively independent of environmental conditions, suggesting that it could be a sufficiently stable habitat to harbour *Mollicutes*. Therefore, *Mollicutes* could be a part of the resident microbial commu-

nity associated with the gut wall, able to survive to a long-term starvation.

Sequences related to *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria* from the gut of the reference specimens were dominant in the clone library of the 72-h starvation experiment (63%) (Tables 2 and S1, Fig. 2c and d). The values of the Shannon index are low after an 8- and a 22-h starvation experiment (1.01 for Rainbow and 0.65 for TAG 8-h-starved shrimps and 0.27 for Rainbow 22-h-starved shrimp). This may be explained by the low number of clones treated per sample. However, we also suggest that microbial density is low and so, molecular approaches favour only the dominant population. After the 72-h starvation experiment, the Shannon index value is high (4.97) as *Gammaproteobacteria*-related sequences were highly diverse. Their dominance could be a possible consequence of the lesser quantity of detectable 16S rRNA genes related to *Deferribacteres*. We also suggest that the *Gammaproteobacteria* were in a latent state in reference shrimps and between 8 and 22 h of starvation, and were actively dividing at 72-h starvation. This could be explained by the switch of the physiological conditions in the empty digestive tract. The elimination of the bolus led to the evacuation of reduced minerals and intake of oxygen. This could have been favourable to the *Proteobacteria* and deleterious to the *Deferribacteres*, which are strict anaerobe microorganisms. Regarding the *Gammaproteobacteria*-related sequences retrieved in the Rainbow reference shrimp clone library, they were all affiliated to the gill chamber clone LBI32 (AM412518, Zbinden *et al.*, 2008). This sequence clusters in the methanotrophic *Gammaproteobacteria* symbionts group. Positive *in situ* hybridization signals were observed on methanotrophic-like bacteria. Hence, these *Gammaproteobacteria*-related sequences are probably site-dependant, which could be due to the geochemical conditions prevailing on this ultramafic site.

One-third of the epsilonproteobacterial sequences from starved shrimps were affiliated to *R. exoculata* gut sequences (99% similarity, Zbinden & Cambon-Bonavita, 2003) and to the *R. exoculata* ectosymbiont thought to be a sulphide-oxidizing chemoautotroph (Polz & Cavanaugh, 1995). Other *Epsilonproteobacteria* and part of the *Gammaproteobacteria* sequences from starved shrimps were affiliated to autotrophic epibiont-like microorganisms mainly associated with a hydrothermal gastropod (Goffredi *et al.*, 2004). Other *Gammaproteobacteria* were affiliated to heterotrophic microorganisms (e.g. *Pseudomonas entomophila* CT573326 and *Alteromonas* sp. AB078014). Moreover, the sequences closely clustering within the *Epsilonproteobacteria* cluster A (99% similarity) were detected in the reference shrimps and also in the 22- and 72-h-starved shrimps (Fig. 2c). Hence, as suggested previously, specific *Proteobacteria* phylotypes could also be part of the local midgut resident microbiota (Polz *et al.*, 1998; Zbinden & Cambon-Bonavita,

2003). From all our libraries, no sequence was affiliated to the gill chamber clones, except one (clone R32R) related to clone LBI32 (96% of similarity). This indicates that in our experiments, on both sites, the gill chamber epibionts were little ingested.

New insights in the shrimp nutrition and role of the microbial communities

Observations of the shrimps' behaviour indicated that they were healthy before and after treatments. Microscopic observations of brush cells showed that they were intact in all specimens, suggesting that the long filaments inserted between microvilli are probably not pathogenic.

Part of the community associated with the bolus was probably ingested nonspecifically with minerals from chimney walls and surrounding seawater (Archaea and some *Proteobacteria* identified within the bolus) and expelled in the faeces. The intake of environmental seawater and chimney particles could play a role in the diet of the host.

The gill epibiont communities are thought to represent the second major nutritive contribution (Gebruk *et al.*, 1993, 1997; Segonzac *et al.*, 1993; Polz & Cavanaugh, 1995). In our analyses, cephalothoracic epibionts do not seem to be that much ingested. Hence, transepidermal exchanges could be the main nutritional source from the gill epibionts as proposed before (Zbinden *et al.*, 2004, 2008).

Microscopic observations, 16S rRNA gene clone libraries analyses and *in situ* hybridizations indicated that gut-associated bacterial communities were rather similar in all specimens from TAG and Rainbow, except for *Gammaproteobacteria*, and presented a limited diversity of phylotypes. Most of the bacterial sequences were related to eukaryote-associated bacteria usually considered as symbiotic, rather than to free-living vent environmental bacteria. Taken together, these data clearly reinforce the hypothesis of a symbiotic relationship between *R. exoculata* and at least certain members of gut-associated bacterial communities.

A previous study had measured autotrophic carbon intake in the gut (Polz *et al.*, 1998). Some of the sequences retrieved in this study were affiliated to the *Proteobacteria* lineage and clustered with sequences from autotrophic bacteria. *Mollitutes* are usually heterotrophic bacteria and may be involved in organic matter degradation. The *Deferribacteres* species are usually heterotrophic microorganisms involved in sulphur compounds and iron cycles. Thus, they may be implicated in the nutrition of the shrimp and in detoxification processes. These results suggest that several metabolic pathways likely co-occur within the epibiotic community.

Culturing attempts are in progress in the laboratory. However, as the epibionts are usually refractory to cultures, metagenomic approaches will be conducted in order to better understand the epibionts' roles.

Acknowledgements

We profusely thank Philippe Crassous (DEEP/LEP, Ifremer) and Isabel Le Disquet (IFR 83 de Biologie Integrative – CNRS/Paris VI) for advice and work at the scanning electron microscope. TEM micrographs were taken by the Service de Microscopie Electronique, IFR 83 de Biologie Integrative – CNRS/Paris VI. Thanks to 'Plateforme Biogenouest' for sequencing work. We thank Anne Godfroy, chief scientist of the EXOMAR cruise, the Captain and crew of R/V *L'Atalante* and ROV *Victor 6000* team for their efficiency. Finally, we are indebted to several colleagues for helpful comments and suggestions. This work was supported by Ifremer, Region Bretagne, GDR ECCHIS and ANR DEEPOASES.

References

- Altschul SE, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R & Stahl DA (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microb* **56**: 1919–1925.
- Bent SJ & Forney LJ (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* **2**: 689–695.
- Brandt C, Adang M & Spence K (1978) The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orygia pseudotsugata*. *J Invertebr Pathol* **32**: 12–24.
- Breznak JA (1982) Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annu Rev Microbiol* **36**: 323–343.
- Casanova B, Brunet M & 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.
- Chaffron S & Von Mering C (2007) Termites in the woodwork. *Genome Biol* **8**: 229.1–229.4.
- 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.
- Clark TB (1984) Diversity of *Spiroplasma* host – parasite. *Israel J Med Sci* **20**: 995–997.
- Copley JTP, Jorgensen PBK & Sohn RA (2007) Assessment of decadal-scale ecological change at a deep Mid-Atlantic hydrothermal vent and reproductive time-series in the shrimp *Rimicaris exoculata*. *J Mar Biol Assoc UK* **87**: 859–867.
- Corbari L, Zbinden M, Cambon-Bonavita M-A, 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. *Aq Biol* **1**: 225–238.

- Desbruyères D, Biscoito M, Caprais J-C *et al.* (2001) Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores Plateau. *Deep-Sea Res Pt 1* **48**: 1325–1346.
- Dubilier N, Giere O, Distel DL & Cavanaugh CM (1995) Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (*Oligochaeta*, *Annelida*) by phylogenetic 16S rRNA sequence analysis and *in situ* hybridization. *Appl Environ Microb* **61**: 2346–2350.
- Dubilier N, Bergin C & Lott C (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* **10**: 725–740.
- Duperron S, Sibuet M, MacGregor BJ, Kuypers MMM, Fisher CR & Dubilier N (2007) Diversity, relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico. *Environ Microbiol* **9**: 1423–1438.
- Duperron S, Halary S, Lorion J, Sibuet M & Gaill F (2008) Unexpected co-occurrence of 6 bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae). *Environ Microbiol* **10**: 433–445.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **30**: 783–791.
- Galtier N, Gouy M & Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* **12**: 543–548.
- Garnier M, Clerc M & Bove JM (1981) Growth and division of *Spiroplasma*: morphology of *Spiroplasma citri* during growth in liquid medium. *J Bacteriol* **147**: 642–652.
- Gebruk AV, Pimenov NV & Savvichev AS (1993) Feeding specialization of Bresiliidae 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**: 94–144.
- Gebruk AV, Southward EC, Kennedy H & Southward AJ (2000) Food sources, behaviour, and distribution of hydrothermal vent shrimps at the Mid-Atlantic Ridge. *J Mar Biol Assoc UK* **80**: 485–499.
- 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 Microb* **70**: 3082–3090.
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **43**: 45–63.
- Harris JM (1993) The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb Ecol* **25**: 195–231.
- Komai T & Segonzac M (2008) Taxonomic review of the hydrothermal vent shrimp genera *Rimicaris* Williams & Rona and *Chorocaris* Martin & Hessler. *J Shellfish Res* **27**: 21–41.
- Krebs C (1989) *Ecological Methodology*. HarperCollins, New York.
- Kumaraswamy R, Van Dongen U, Kuenen J & Muyzer G (2005) Characterization of microbial communities removing nitrogen oxides from flue gas: the BioDeNOx process. *Appl Environ Microb* **71**: 6345–6352.
- Lin X, Wakeham SG, Putnam IF, Astor YM, Scranton MI, Chistoserdov AY & Taylor GT (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 Microb* **72**: 2679–2690.
- Maniloff J & Morowitz HJ (1972) Cell biology of the *Mycoplasmas*. *Bacteriol Rev* **36**: 263–290.
- 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.
- Mercer EH & Day MF (1952) The fine structure of the peritrophic membranes of certain insects. *Biol Bull* **103**: 384–394.
- Milne-Edwards H (1840) *Histoire naturelle des crustacés, comprenant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux*. Librairie encyclopédique de Roret, Paris, France.
- Miroshnichenko ML, Slobodkin AI, Kostrikin NA, L'Haridon S, Nercessian O, Spring S, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya EA & Jeanthon C (2003) *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microb* **5**: 1637–1641.
- Nercessian O, Reysenbach A-L, Prieur D & Jeanthon C (2003) Archaeal diversity associated with *in situ* samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). *Environ Microbiol* **5**: 492–502.
- Nercessian O, Fouquet Y, Pierre C, Prieur D & Jeanthon C (2005) Diversity of *Bacteria* and *Archaea* associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **7**: 698–714.
- Polz M & Cavanaugh C (1995) Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *P Natl Acad Sci USA* **92**: 7232–7236.
- Polz M, Robinson JJ, Cavanaugh C & 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, Sargent JR, Fallick AE, Allen C, Bell MV & Dixon DR (2000) $\delta^{13}\text{C}$ values of lipids from phototrophic zone microplankton and bathypelagic shrimps at the Azores sector of the Mid-Atlantic Ridge. *Deep-Sea Res Pt 1* **47**: 121–136.
- Quince C, Curtis TP & Sloan WT (2008) The rational exploration of microbial diversity. *ISME J* **2**: 997–1006.
- Ravaux J, Gaill F, Bris NL, Sarradin P-M, Jollivet D & Shillito B (2003) Heat-shock response and temperature resistance in the deep-sea vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *J Exp Biol* **206**: 2345–2354.
- Razin S (1978) The *Mycoplasmas*. *Microbiol Rev* **42**: 414–470.
- Razin S (1998) Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol Mol Biol R* **62**: 1094–1156.
- Regassa LB & Gasparich GE (2006) *Spiroplasma*s: evolutionary relationships and biodiversity. *Front Biosci* **11**: 2983–3002.
- Reysenbach A-L, Longnecker K & Kirshtein J (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber

- deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microb* **66**: 3798–3806.
- Rieley G, Van Dover CLV, Hedrick DB & Eglinton G (1999) Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*?: a combined lipid abundance/stable isotope approach. *Mar Biol* **133**: 495–499.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Schmidt C, Vuillemin R, Le Gall C, Gaill F & Le Bris N (2008) Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps. *Mar Chem* **108**: 18–31.
- Schrenk MO, Kelley DS, Delaney JR & Baross JA (2003) Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Appl Environ Microb* **69**: 3580–3592.
- Segonzac M, de Saint Laurent M & Casanova B (1993) L'énigme du comportement trophique des crevettes Alvinocarididae des sites hydrothermaux de la dorsale medio-Atlantique. *Cah Biol Mar* **34**: 535–571.
- Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J* **27**: 379–423 and 623–656.
- Shillito B, Jollivet D, Sarradin P-M, Rodier P, Lallier F, Desbruyeres D & Gaill F (2001) Temperature resistance of *Hesiolyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker wall. *Mar Ecol-Prog Ser* **216**: 141–149.
- Stahl D & Amann R (1991) Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrandt E & Goodfellow M, eds), pp. 205–247. Wiley Inc., New York.
- Takai K & Horikoshi K (1999) Genetic diversity of *Archaea* in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**: 1285–1297.
- 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 Ac Res* **22**: 4673–4680.
- 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.
- Wang Y, Stingl U, Anton-Erxleben F, Geisler S, Brune A & Zimmer M (2004a) 'Candidatus Hepatoplasma crinochetorum', a new, stalk-forming lineage of *Mollicutes* colonizing the midgut glands of a terrestrial isopod. *Appl Environ Microb* **70**: 6166–6172.
- Wang Y, Stingl U, Anton-Erxleben F, Zimmer M & Brune A (2004b) 'Candidatus Hepatocola porcellionum' gen. nov., sp. nov., a new, stalk-forming lineage of *Rickettsiales* colonizing the midgut glands of a terrestrial isopod. *Arch Microbiol* **181**: 299–304.
- Wang Y, Brune A & Zimmer M (2007) Bacterial symbionts in the hepatopancreas of isopods: diversity and environmental transmission. *Microb Ecol* **61**: 141–152.
- Williams AB & Rona PA (1986) Two new caridean shrimps (Bresiliidae) from a hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *J Crustacean Biol* **6**: 446–462.
- Zachary A & Colwell RR (1979) Gut-associated microflora of *Limnoria tripunctata* in marine creosote-treated wood pilings. *Nature* **282**: 716–717.
- Zachary A, Parrish KK & Bultman JD (1983) Possible role of marine bacteria in providing the creosote-resistance of *Limnoria tripunctata*. *Mar Biol* **75**: 1–8.
- Zbinden M & Cambon-Bonavita M-A (2003) Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *Microb Ecol* **46**: 23–30.
- Zbinden M, Le Bris N, Gaill F & 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, Gaill F & Cambon-Bonavita M-A (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.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Rarefaction curves of the bacterial 16S rRNA genes of epibionts associated with the *Rimicaris exoculata* gut.

Fig. S2. Digestive tract of *Rimicaris exoculata*.

Table S1. Distribution of the bacterial 16S rRNA gene clones per OTU.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

1.2 - Conclusions de cette étude

Rappel des principaux résultats – Le fait marquant de cette étude est la mise en évidence, par l'association de plusieurs techniques, d'une communauté microbienne résidente complexe dans le tractus digestif de *R. exoculata*. L'approche moléculaire a montré que celle-ci est composée de quatre groupes phylogénétiques : les *Deferribacteres*, les *Mollicutes*, les *Epsilonproteobacteria* et les *Gammaproteobacteria*. La microscopie a montré des bâtonnets libres ou en agrégats dans la lumière du tube digestif affiliés aux *Deferribacteres* et *Proteobacteria* par hybridations *in situ*. Mais elle a surtout mis en évidence une population dense d'épibiontes filamenteux étroitement associés à l'épithélium du mésentéron de l'hôte. Ils s'insèrent entre les microvillosités des cellules épithéliales et sont clairement séparés du bol alimentaire par la membrane péritrophique. Ces épibiontes sont observés chez tous les individus étudiés, qu'ils proviennent du site Rainbow ou TAG, que ce soit des spécimens de référence ou soumis à un jeûne long de 72 heures et les tissus sous-jacents sont sains. Ils ne sont donc pas pathogènes. Mais il n'a pas été possible de déterminer leur affiliation phylogénétique par hybridations *in situ* au-delà du domaine des *Bacteria* malgré des hybridations réalisées à diverses conditions de stringence et température et l'utilisation de nombreuses sondes (micro-organismes ciblés : *Bacteria*, *Archaea*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, épibionte intestinal *Deferribacteres*, épibiontes intestinaux *Epsilonproteobacteria*, épibionte céphalothoracique *Gammaproteobacteria*). J'ai donc essayé différentes approches alternatives pour tenter de pallier ce problème.

Expériences complémentaires - La première idée a été d'effectuer une amplification du gène de l'ARN ribosomal 16S non plus sur un tube digestif entier mais sur une portion restreinte afin de limiter les groupes microbiens présents et de favoriser l'amplification de l'ADN des épibiontes filamenteux. Pour cela, j'ai utilisé une section de tube digestif de 8 μm d'épaisseur. Au préalable, j'ai contrôlé la présence des filaments dans la zone sectionnée par hybridation *in situ* des sections flanquantes. Malheureusement, l'amplification met toujours plusieurs groupes microbiens en évidence alors qu'en microscopie, seuls les filaments étaient visibles.

Les observations microscopiques ont montré que les filaments représentaient la communauté microbienne principale parmi les épibiontes, en prenant en compte leur densité de population. La seconde alternative était alors d'utiliser une méthode d'amplification qui permettrait de quantifier l'ADN afin de déterminer le groupe majoritaire. La PCR quantitative n'était pas envisageable puisque nous n'avions pas d'amorces spécifiques aux différents groupes microbiens épibiontes disponibles au moment de l'étude. J'ai donc traité les échantillons en chromatographie liquide dénaturante haute performance (DHPLC pour Denaturing High Performance Liquid Chromatography). Cette technique

permet de séparer les populations en fonction de la séquence du fragment ADN amplifié sur colonne d'affinité. En théorie, un pic correspond à une séquence donnée et l'aire sous le pic est proportionnelle à la quantité d'amplicon correspondant. Ainsi, les résultats devaient permettre de « quantifier la diversité microbienne » sur différents spécimens. Mais cette technique n'a pas permis de conclure. Au moins trois des principaux groupes d'épibiontes étaient mis en évidence sur chacun des individus, indépendamment du site d'origine et de la condition de l'hôte (référence ou jeûne long) et l'intensité des pics n'était pas reproductible.

Finalement, ce sont les hybridations *in situ* réalisées en parallèle sur les cultures qui ont permis d'avancer. Le nombre de spécimens disponibles étant limité, les hybridations *in situ* du tractus digestif avaient toujours été réalisées en co-localisation (pour renforcer les résultats) afin de réduire le nombre de sections à hybrider. C'est-à-dire qu'une même section était hybridée avec une sonde spécifique, marquée avec un fluorophore A, et avec la sonde universelle *Eubacteria*, marquée avec un fluorophore B. Or, les hybridations sur les cultures ont révélé une « incompatibilité » du couple de sondes universelles *Eubacteria/Epsilonproteobacteria* selon les fluorophores utilisés. En effet, l'hybridation d'un même échantillon est positive avec chacune des sondes du couple utilisée séparément. Mais la co-localisation avec la sonde universelle *Eubacteria* éteint le signal de la sonde spécifique *Epsilonproteobacteria*. Ces observations sur les cultures se sont vérifiées sur les sections de tube digestif sans pouvoir expliquer le phénomène. Les épibiontes filamenteux ont donc été affiliés aux *Epsilonproteobacteria*. Cependant, l'intensité du signal reste plus faible avec la sonde *Epsilonproteobacteria* qu'avec la sonde *Eubacteria*.

Aucune bactérie intacte n'avait été observée dans l'estomac en 2003 (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003). Par conséquent mon travail s'est focalisé sur l'étude du tube digestif sans l'estomac. Cependant, j'ai tout de même réalisé des observations en microscopie électronique à balayage et des hybridations *in situ* sur des estomacs de *R. exoculata*. Elles ont montré la présence d'agrégats bactériens le long de la paroi interne de l'organe (**Fig.39A-C**). Ce type d'agrégats microbiens n'a pas été observé dans l'intestin.

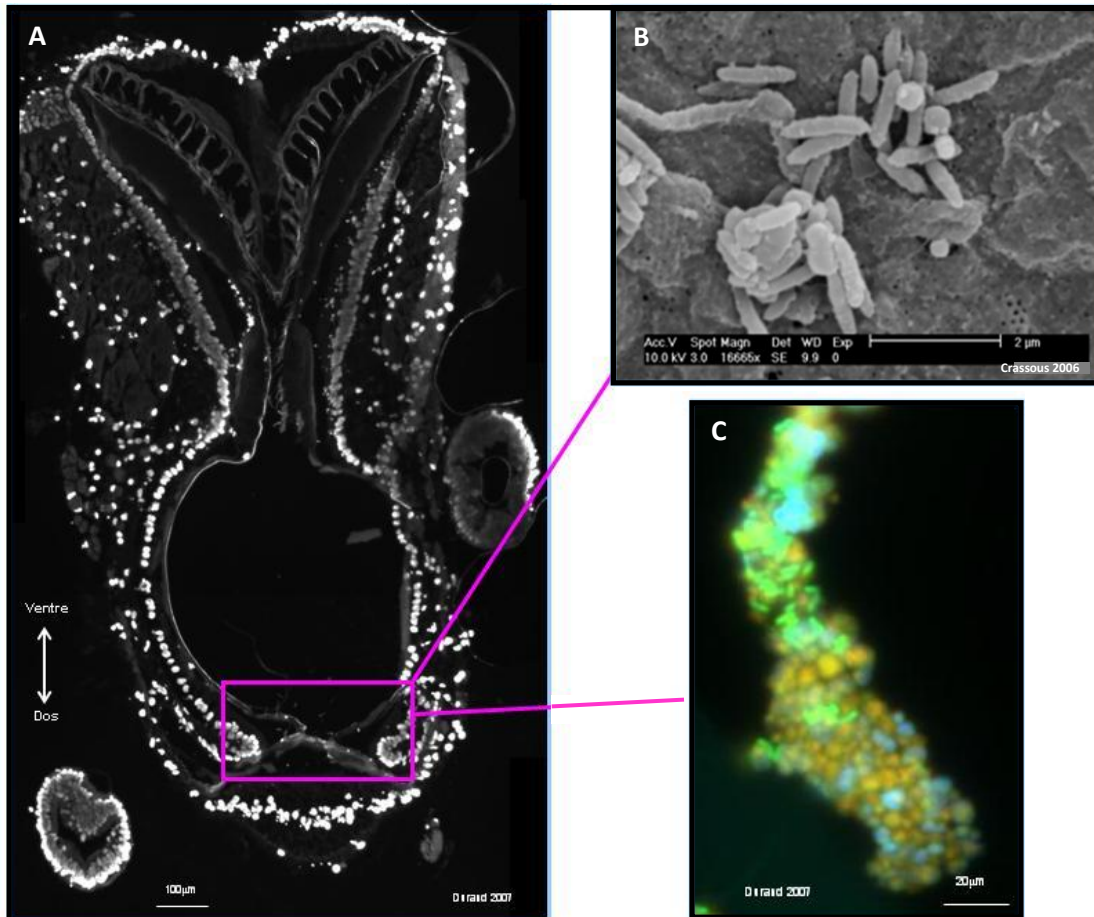


Fig.39 – Observation en microscopie à épifluorescence (A, C) et électronique à balayage (B) de l'estomac de *R. exoculata*. Sur les clichés de microscopie à épifluorescence, l'ADN marqué au DAPI est visible en blanc (A) et bleu (C), le rouge correspond à la sonde universelle *Eubacteria* (Eub338) marquée au Cy5 et le vert correspond à la sonde ciblant les épibiontes *Deferribacteres* du tractus digestif de la crevette (Def572) marquée au Cy3.

Ces agrégats sont composés de micro-organismes à morphologie irrégulière coccoïde rappelant la morphologie polymorphe des bactéries dépourvues de paroi cellulaire comme les *Mollicutes*. Les hybridations n'ont pas permis d'affilier ces bactéries. La périphérie de certains de ces agrégats microbiens est colonisée par des petits bacilles montrant un signal positif avec la sonde ciblant les épibiontes *Deferribacteres* du tractus digestif de *R. exoculata*. Les observations de l'estomac en microscopie électronique à balayage confirment la présence d'agrégats le long de la paroi stomacale (**Fig.39B**). Les micro-organismes les composant semblent viables et certains sont en division. La morphologie coccoïde n'a pas été retrouvée dans l'intestin à la différence des *Deferribacteres*. Ces petits bacilles sont situés dans la lumière du tube digestif avec le bol alimentaire, seuls ou en petits agrégats. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir des populations distinctes dans l'estomac et dans l'intestin. Or, les analyses moléculaires ont été réalisées sur des intestins et non sur le tractus digestif dans son entier. Pour confirmer (ou infirmer) cette hypothèse, il faudrait comparer la

diversité des populations épibiontes des deux parties du tractus digestif par des techniques d’empreinte génétique qui pourront au besoin être complétées par un séquençage.

Nous disposons de très peu de spécimens mais une étude préliminaire a été entreprise pour comparer la structure et la diversité microbienne associée au tractus digestif d’autres crevettes que *R. exoculata* adulte, inféodées aux écosystèmes hydrothermaux. Quelques observations en microscopie électronique et des hybridations *in situ* du système digestif de spécimens de *R. exoculata* juvénile (2 cm), *Mirocaris fortunata* (Martin et Christiansen 1995) et *Chorocaris chacei* (Williams et Rona, 1986) ont été réalisées afin d’évaluer l’intérêt de poursuivre l’étude comparative. *M. fortunata* (Decapoda : Alvinocarididae), peut atteindre jusqu’à 3 cm de long au stade adulte et semble être microphage et/ou détritivore. *C. chacei* (Decapoda : Alvinocarididae), peut atteindre jusqu’à 7 cm de long au stade adulte et est nécrophage. Ces deux crevettes sont des espèces endémiques de certains sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique. L’anatomie comparée du tractus digestif des trois espèces a révélé quelques différences. A commencer par le volume de l’estomac proportionnellement à la taille du crustacé : il tient une proportion très importante chez *C. chacei* adulte et plus réduite chez *R. exoculata* adulte. La cuticule interne du tractus est très rigide chez le spécimen de *C. chacei*, un peu moins chez *M. fortunata* et beaucoup plus souple chez *R. exoculata*. Ceci pourrait être en rapport avec l’épaisseur de la cuticule, ce qui favoriserait les échanges avec les épibiontes pour *R. exoculata*, qui est à l’heure actuelle la seule espèce dont une épibiose a été décrite. Les observations en microscopie électronique montrent également que les structures internes de l’estomac sont propres à l’espèce. Par exemple, la densité des épines est importante chez l’espèce *M. fortunata* (**Fig.40A**) mais beaucoup moins chez *R. exoculata*, voire inexistante chez les individus adultes (**Fig.40D**).

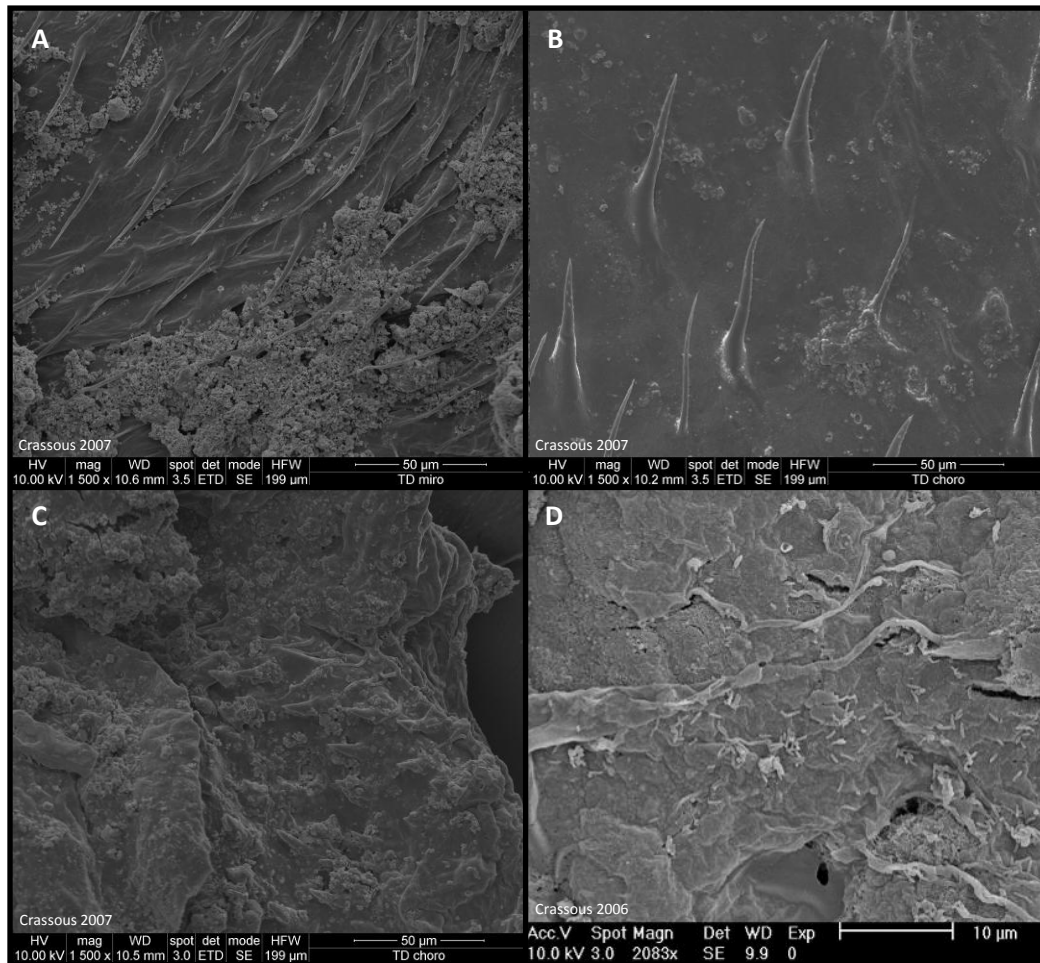


Fig.40 – Observation des structures de la cuticule interne de l'estomac de *M. fortunata* (A), *C. chacei* (B), *R. exoculata* juvénile (C) et adulte (D) en microscopie électronique à balayage. Des micro-organismes sont visibles sur la paroi stomacale du spécimen de *R. exoculata* adulte (D).

Les trois espèces ont un système de soies stomacales relativement développé ce qui semble indiquer un rôle primordial dans le traitement du bol alimentaire. La composition du contenu digestif n'a pas été analysée chimiquement mais les observations microscopiques montrent une forte différence pour l'espèce *C. chacei* tandis que ceux de *R. exoculata* et *M. fortunata* semblent plutôt proches. En effet, il s'agit d'une « pâte » relativement homogène riche en minéraux pour les deux dernières espèces. Mais le contenu du tractus digestif de *C. chacei* est plus hétérogène : il n'est pas composé de cette « pâte » riche en minéraux. Certes, il contient de particules de roches hydrothermales, mais elles sont visibles à l'œil nu. Il contient aussi beaucoup de fragments de cuticule pouvant provenir d'exuvies ou de la carapace d'autres crustacés (morts ou vivants ?). Des restes d'antennes de crustacés ont également été retrouvés dans le bol alimentaire de cette espèce. Sans considérer un éventuel apport énergétique grâce à un microbiote digestif spécifique, il est donc probable que le régime alimentaire de *R. exoculata* soit assez proche de celui de *M. fortunata*, mais bien différent de celui de *C. chacei*.

Aucun signal positif n'a été obtenu lors des hybridations *in situ* sur le tractus digestif du spécimen de *R. exoculata* juvénile. Les sections observées ne comportaient aucune bactérie. En revanche, les hybridations sur *M. fortunata* et *C. chacei* ont révélé la présence de certaines morphologies (telles que des grosses bactéries filamenteuses segmentées) et groupes bactériens (comme les *Betaproteobacteria*) non observés chez *R. exoculata* adulte (**Fig.41B**). Cependant, des filaments semblables aux épibiontes du mésentéron de *R. exoculata* adulte ont été observés en microscopie électronique dans le bol alimentaire de *M. fortunata* (**Fig.41A**) et fixés à la paroi de la partie antérieure du mésentéron de *C. chacei* (**Fig.41C-D**).

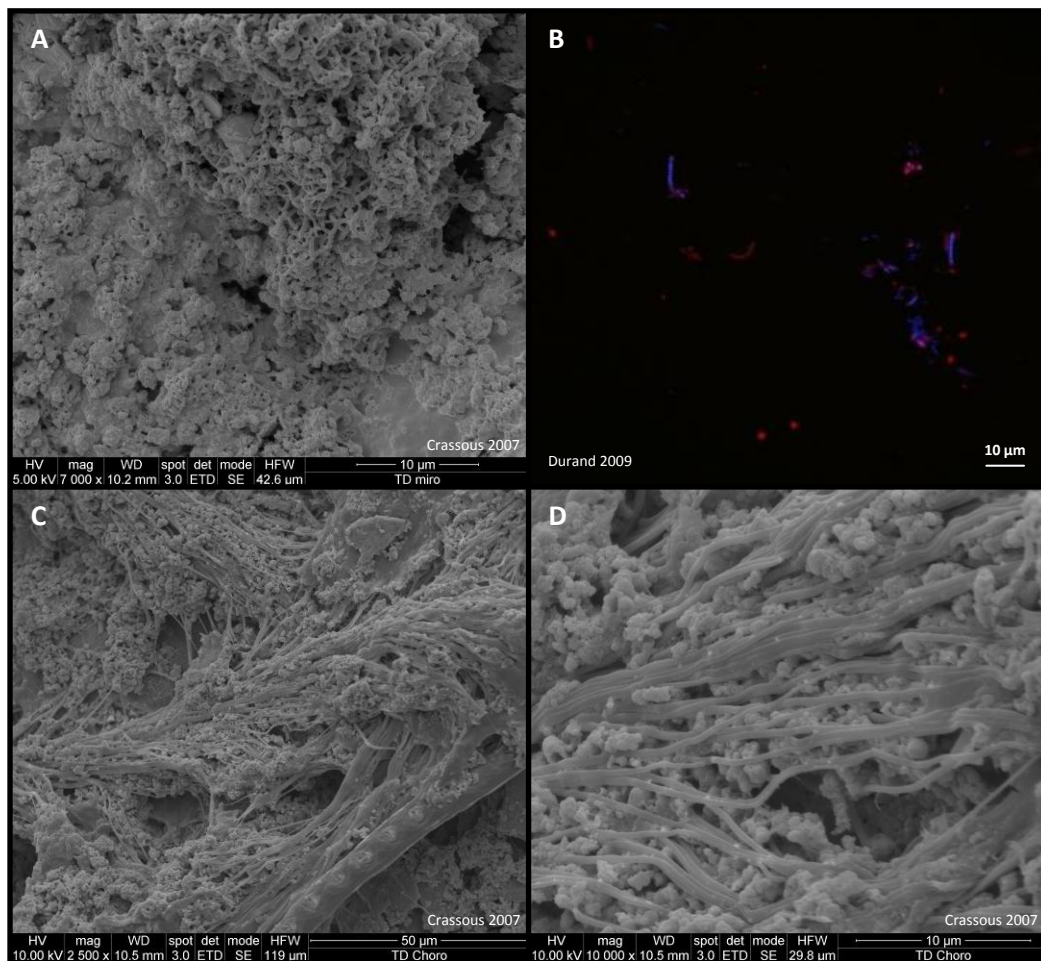


Fig.41 – Observations microscopiques du mésentéron de crevettes hydrothermales : contenu digestif de *M. fortunata* observé en microscopie électronique à balayage montrant des filaments enchevêtrés (A) et en épifluorescence (B) montrant des bactéries filamenteuses et des bacilles (marquage de l'ADN au DAPI en bleu, hybridation avec une sonde universelle ciblant les *Betaproteobacteria* marquée au Cy3 en rouge). Filaments observés en microscopie électronique à balayage dans la partie antérieure du mésentéron de *C. chacei* (C-D).

Le seul échantillon d'intestin du spécimen de *R. exoculata* juvénile disponible à ce moment s'est colmaté lors du passage au point critique ce qui a empêché par la suite de l'ouvrir dans sa longueur et ainsi d'observer l'intérieur du tube digestif en microscopie électronique. Des observations

supplémentaires seront nécessaires. Il faut réaliser d'autres hybridations *in situ* car les premières hybridations n'ont pas permis de confirmer la présence de ces filaments probablement d'origine bactérienne chez les spécimens *M. fortunata* et *C. chacei* ou la présence des épibiontes chez le spécimen *R. exoculata* juvénile. Pour cela, une nouvelle collecte de spécimens s'avère nécessaire. Elle permettra aussi de compléter l'étude par une approche moléculaire, et pourquoi pas culturale.

Ventiella sulfuris
(Crustacea : Amphipoda)

2 - Exemple de *Ventiella sulfuris* (Crustacea : Amphipoda) : « New digestive symbiosis in the hydrothermal vent amphipoda *Ventiella sulfuris* » Corbari et al., soumis (*Biol. Bull.*)

2.1- Introduction de l'étude

Contexte scientifique - Les symbioses dans les écosystèmes hydrothermaux ont été décrites pour un certain nombre d'espèces. Les crustacés, avec les bivalves et les annélides, sont un des principaux groupes dans lesquels les interactions durables sont relativement fréquentes. Ainsi, en parallèle de l'étude du modèle de crustacé décapode *R. exoculata*, une étude préliminaire a été réalisée sur un autre crustacé inféodé aux écosystèmes hydrothermaux : l'amphipode *Ventiella sulfuris*. Cette étude a été réalisée en collaboration avec L. Corbari, Maître de Conférences au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (UMR 7138, Systématique, Adaptation, Evolution) et l'équipe de P. Compère, chef de travaux à l'Université de Liège, Belgique (Morphologie Ultrastructurale).

Etat de l'art - *Ventiella sulfuris* (Amphipoda : Lysianassidae), est endémique des écosystèmes hydrothermaux (Barnard et Ingram, 1990). Cette espèce d'amphipode est la plus abondante des champs hydrothermaux de la ride est-Pacifique ou EPR (Vinogradov, 1993, 1995 ; Bellan-Santini, 1998). Bien que *V. sulfuris* représente plus de 98 % des amphipodes hydrothermaux de l'EPR, l'écologie et les adaptations de cet animal aux environnements hydrothermaux sont très peu connues (Sheader et Van Dover, 2007) si ce n'est qu'il vit en association avec les colonies de vers tubicoles *Alvinella pompejana* qui hébergent une importante communauté microbienne sur leur tégument dorsal.

Méthodologie utilisée et résultats obtenus - Les spécimens de *V. sulfuris* ont été collectés au cours de la campagne océanographique LADDER II sur le site hydrothermal Bio9 (9°50.3'N, 2508 m de profondeur) de la ride est-Pacifique. Les observations en microscopie photonique et électronique à balayage et à transmission montrent que la surface externe de la carapace et les appendices sont dépourvus de micro-organismes. Par contre, deux zones de colonisation microbienne sont mises en évidence dans le tractus digestif : le mésentéron et le proctodeum. Les deux communautés microbiennes montrent des caractéristiques typiques de la symbiose. Les observations du contenu digestif révèlent une quantité abondante de fragments de cuticule d'annélide, provenant probablement d'*A. pompejana*. Cela suggère que cette espèce d'amphipode pourrait se nourrir notamment du tégument dorsal des vers, avec ou sans les épibiontes dorsaux. Les analyses

moléculaires basées sur le gène de l'ARNr 16S suggèrent la présence de diverses communautés bactériennes dans le tractus digestif. Parmi elles, le phylum des *Epsilonproteobacteria*, un des principaux groupes des bactéries associées à l'amphipode, pourrait être spécifique à l'hôte. Ces résultats révèlent de nouvelles symbioses potentielles chez les crustacés hydrothermaux et mettent en évidence l'importance des amphipodes dans le réseau trophique des écosystèmes hydrothermaux.

Running title: Digestive symbiosis in vent amphipod

New Digestive Symbioses in the Hydrothermal Vent Amphipoda

Ventiella sulfuris

Laure Corbari^{1*}, Lucile Durand², Marie-Anne Cambon-Bonavita², Françoise Gaill³ and Philippe Compère⁴.

¹ Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Systématique et Evolution, UMR 7138

“Systématique, Adaptation et Evolution”, Equipe Espèces et Spéciation 57 Rue Cuvier, CP 26, F-75231 Paris Cedex 05, France.

²Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, Ifremer, Centre de Brest, BP 70, F-29280 Plouzané, France

³Université Pierre et Marie Curie, UMR CNRS 7138 ‘Systématique, Adaptation et Evolution’, 7 Quai St Bernard, Bâtiment A, F-75252 Paris Cedex 05, France

⁴Université de Liège, Laboratoire de Morphologie Fonctionnelle et Evolutive, Unité de Morphologie Ultrastructurale, allée de la chimie, 3, B-4000 Liège, Belgium

*Corresponding author: Laure Corbari

E-mail : corbari@mnhn.fr

Tel: +33 (0)1 40 79 30 94

Fax : +33 (0)1 40 79 38 44

Key words: hydrothermal vents, Amphipoda, Bacterial symbiosis, midgut, hindgut

Abstract

Ventiella sulfuris is the most abundant amphipod species inhabiting the Eastern Pacific Rise (EPR 9°N) vent fields. This vent-endemic species is commonly encountered near colonies of Pompeii worms *Alvinella pompejana*. *V. sulfuris* specimens were collected during the oceanographic cruise LADDER II at the Bio9 (9°50.3'N, 2508m depth) hydrothermal vent site. Observations in light and electron microscopy (SEM, TEM) showed that the outer body surface and appendages are free of micro-organisms. In contrast, the digestive system revealed two important microbial communities settled in the midgut and in the hindgut respectively. Both exhibited typical characteristics of symbiosis. Observations of the gut content showed abundant fragments of annelid cuticle, probably from *A. pompejana*, suggesting that the amphipod species could graze on the dorsal integument of the worms. Molecular analyses based on the 16S rRNA genes suggested the presence of diverse bacterial communities in the digestive system, of which, the *Epsilonproteobacteria* phylum, could be considered as one of the major group of symbiotic bacteria, specific to *V. sulfuris*. These results revealed new potential bacterial symbioses in vent crustaceans and pointed out the importance of amphipods in the trophic relationships of hydrothermal vent ecosystems.

INTRODUCTION

Ventiella sulfuris (Amphipoda, Lysianassidae) was first described by Barnard and Ingram in 1990 and is considered as the most abundant vent-endemic amphipod species inhabiting the Eastern Pacific Rise vents (EPR 9°N) (Vinogradov, 1993 and 1995; Bellan-Santini, 1998). This endemic species is commonly encountered near colonies of Pompeii worms *Alvinella pompejana*. Although *V. sulfuris* represents more than 98% of the EPR vent amphipods, little is known about its ecology or adaptations to vent environments (Sheader and Van Dover, 2007). Amphipods have frequently been recorded as a dominant component of the vent macrofauna (Sheader *et al.*, 2004), though none have been found yet to harbour symbiotic relationships. Despite their abundance, amphipods remain one of the least studied taxonomic groups at hydrothermal vents (Vinogradov, 1993).

Owing to the extreme conditions prevailing in hydrothermal vent ecosystems, symbiosis between chemoautotrophic bacteria and metazoans appear to be the rule and can be regarded as one of the most successful adaptations to these environments (Childress, 1995; Cavanaugh *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2005). Many hydrothermal organisms derive their nutrition from chemoautotrophic bacteria through symbioses relying most often on sulphide or methane as an energy source (Ott *et al.*, 2004; Cavanaugh *et al.*, 2006; Dubilier *et al.*, 2008). In this perspective, species strictly endemic to hydrothermal vents can be considered as potential hosts for chemosynthetic microorganisms. The presence of bacterial epibiosis or ectosymbiosis has been reported in vent crustaceans such as the galatheid *Kiwa hirsuta* (Goffredi *et al.*, 2008) ; the hermit crab *Paragiopagurus ventilatus* (Lemaitre, 2004) and more recently in the barnacle *Vulcanolepas* (Suzuki *et al.*, 2009). But the most exemplar case of symbiosis in a vent crustaceans, is indubitably represented by the vent shrimp *Rimicaris exoculata*, which dominates the Mid-Atlantic Ridge ecosystems. This shrimp possesses an original ectosymbiotic bacterial community (i.e. mainly *Gamaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*) housed in its expanded gill chamber and on its mouth parts (Van Dover *et*

al., 1988; Casanova *et al.*, 1993; Polz and Cavanaugh, 1995; Zbinden *et al.*, 2008; Corbari *et al.*, 2008). Moreover, a digestive symbiosis involving *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilonproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria* has also been observed in *R. exoculata*, further suggesting that microflora could significantly contribute to the shrimp nutrition (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Durand *et al.*, submitted).

Bacterial digestive symbioses have been extensively described in several groups of crustaceans (Bignell, 1984; Harris, 1993; Drobne, 1995). Bacteria, protozoan or even fungi can be involved and are mainly attached to the cuticular lining of the hindgut (posterior part of the digestive tract). Bacteria can however be found in the midgut, which is lined by endodermal cells with microvillous brush border.

The purpose of the present work was to research the presence of potential symbiotic bacteria in *Ventiella sulfuris* and to investigate their role in its nutrition. Microscopic and ultrastructural observations have been focused on the integument and mainly on the gut content and the lining of the different functional parts of the digestive tract. The external integument and the digestive tract of amphipod specimens (n = 15) were observed in light microscopy (LM) and electron microscopy (SEM, TEM). The cuticle surface of the outer body and appendages appeared to be free of microorganisms. In contrast, the observations of the digestive tract reveal two important bacterial colonization zones retrieved in the midgut and hindgut respectively. Both exhibit attachment patterns that are characteristic of symbiotic interactions (Bignell, 1984; Harris, 1993). Phylogenetic analyses based on the 16S rRNA genes were used to characterize the bacterial diversity associated with *V. sulfuris* and suggested that some of these communities could be considered as potential symbiotic bacteria involved in the nutrition of this vent amphipod.

MATERIALS AND METHODS

Specimen collection

Ventiella sulfuris specimens were collected together with tubeworm colonies of *Alvinella Pompejana* during the American cruise “LADDER II” (December 2006) at the East Pacific Rise hydrothermal vent site Bio9 (9°50.3’N, 104°17.48’W; 2508m depth). These colonies were collected by the deep submergence vehicle (DSV) ALVIN operating from the RV “Atlantis”. On board, *Alvinella* colonies were immediately washed 3 times with seawater to wash off the sediment and the associated vagile fauna. Washings were sieved on a 500 µm mesh to retain the associated fauna. Immediately after collection, living *V. sulfuris* specimens were fixed in a 2.5 % glutaraldehyde-seawater solution at pH 7.2 and preserved in a seawater-NaN₃ 6.7 mM solution.

Microscopy

Light Microscopy (LM) and Transmission Electron Microscopy (TEM)

Light and electron microscopic observations were performed on *V. sulfuris* specimens to locate and identify the occurrence of potential symbiotic bacteria. The external cuticle and gut lining were considered and observed for a total of 15 specimens. Three segments of the digestive tract were considered and observed separately (Fig. 1), the foregut with the stomach (stomodeum), the midgut (mesenteron) and the hindgut (proctodeum).

Entire specimens of *V. sulfuris* fixed in glutaraldehyde (n = 5) were post-fixed in osmium 1%, dehydrated in ethanol and propylene oxide series and then embedded in epoxy resin (SPI-PON 812, Struers). In order to investigate the general organisation of the digestive tract and associated tissues, serial semi-thin sections (1-2 µm) were performed transversally and longitudinally in two specimens with a spacing of 150 µm and 50 µm respectively. The remaining specimens (n = 3) were used to confirm the presence of bacteria at specific levels of the digestive tract. Semi-thin and ultrathin sections were obtained from a Reichert-Jung Ultramicrotome (Ultracut E) using a diamond

knife. Semi-thin sections were then stained with toluidine blue (pH 9.0) for observations with light microscopy (Olympus SZ40). Classical uranium acetate and lead citrate staining was applied to contrast ultra-thin sections that were observed in a Jeol (JEM 100-SX) transmission electron microscope operating at 80 kV.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The external morphology (n = 2) and the gut content and the morphology of the gut lining (n = 8) were examined using SEM. Samples were dehydrated through ethanol series, critical point-dried and platinum-coated (20 nm) in a Balzers SCD-030 sputter unit before observations in a SEM JEOL (JSM-840A) at a 20 kV accelerating voltage.

Molecular analyses

16S rRNA gene sequences analyses

Three glutaraldehyde-fixed specimens of *V. sulfuris* were dedicated to molecular analyses. Due to the weak number of specimens and the non-adequate fixation, the external carapace of specimens (n = 3) was removed under sterile conditions and discarded to limit contamination by exogenous bacteria and the inner tissues with their gut-associated microorganisms were kept and pooled together. The total DNA was extracted using the FastDNA[®] SPIN kit for soil (QBIogen, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's instructions and stored at 4°C. Amplifications of the bacterial 16S rRNA genes were performed with universal primers E8F/U1492R (respectively 5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG3' and 5'GTTACCTTGTTACGACTT3', 1384 bp, annealing temperature 49°C) or E338F/U1407R (respectively 5'ACTCCTACGGGAGGCAGC3' and 5'GACGGGCGGTGGWTRCAA3', 1071 bp, annealing temperature 54°C). Amplifications were performed on a robocycler GeneAmp[™] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) under the following conditions: 3 min at 94°C, then 30 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at the

annealing temperature and 2 min at 72°C, and a final step of 6 min at 72°C. DNA was amplified in a 50 µL reaction mix composed of 5 µL Taq buffer 10X (QBIogen), 1 µL dNTP mix 40 mM (QBIogen), 0.2 µL of each primer 100 µM (Eurogentec, Liège, Belgium), 0.5 µL Taq polymerase 5 U/µL (QBIogen) and approximately 30 ng DNA template. PCR products were cloned using the TOPO[®] XL Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Positive clones were treated for sequencing at the "Plateforme Biogenouest" (Roscoff, France, <http://www.sb-roscoff.fr/SG/>) with an Abi prism™ 3100 GA using the Big-Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems).

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were performed to assess sequence affiliations. Sequences were compared to the Genbank database using the BLAST network service (Altschul *et al.*, 1990). They were aligned using CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) and edited using SEAVIEW (Galtier *et al.*, 1996). Phylogenetic trees were constructed using PHYLO-WIN (Galtier *et al.*, 1996). The robustness of inferred topologies was tested using 500 bootstraps re-sampling of the trees (Felsenstein, 1985) calculated on the basis of evolutionary distance (neighbor-joining algorithm, Saitou and Nei, 1987) with Kimura two parameters correction matrix. Sequences displaying more than 98 % similarity were considered to belong to a single phylotype and were grouped together. Only homologous positions were included in the final alignment. Sequences are available from the EMBL nucleotide sequence database under accession numbers FN429814 to FN429863.

RESULTS

Morphology and ultrastructure of the digestive system

An in-depth SEM examination of 3 specimens of *V. sulfuris* specimens revealed that the outer cuticular body surface including appendages and gills is free of bacteria. Microscopic

investigations have also been focused on the morphology, lining and content of the different functional parts of the digestive system (Fig. 1) including the hepatopancreas. In contrast to the body surface, the digestive tract harbors two important bacterial colonizations that are recurrent in the 13 individuals analyzed and are retrieved in the midgut and the hindgut respectively.

General features of the digestive system

As usual in amphipods (Icely and Nott, 1984, Johnston *et al.*, 2004) and as observed in *V. sulfuris*, the digestive system comprises a foregut, a midgut and a hindgut (Fig. 1B). The foregut and the hindgut are derived from stomodeal and proctodeal ectoderm, respectively, and are lined throughout with cuticle. The midgut is derived from endoderm and has no cuticle. It is the longest region of the digestive tract, which links directly with the hindgut and is enlarged by the development of seven caeca (i.e. a single anterior dorsal caecum, two pairs of digestive ventral caeca and a pair of posterior caeca).

Digestive content

Microscopic observations (LM, TEM and SEM) of the digestive content of *Ventiella sulfuris* (Fig. 2A) have revealed the presence of large pieces of crustacean cuticle, fragments of diatom frustules (2-6 μm) and mineral particles (2-5 μm). Prevailing in the digestive content, large pieces of non-chitinous cuticle have been observed all along the digestive tract (Fig. 2B-C). These structures exhibit a two-layer architecture with an outer dense epicuticle and a network of large intermixed fibres (Fig. 2C) arranged in an orthogonal plywood system. This architecture corresponds to that of the cuticle of annelids (Lepescheux, 1998), and can be identified as cuticle of alvinellid worms (Gaill and Hunt, 1991) that contains large collagen fibres. Such an orthogonal plywood system indicates that these structures can be specifically identified as collagenous cuticle fragments of the Pompeii worms, *Alvinella Pompejana* (Fig. 2C). These fragments are very abundant all along the digestive tract, from the stomach to the hindgut. TEM observations of the stomachal content has

revealed the presence of ingested bacteria, some are intact and other are degraded (Fig. 2D). Numerous fragments of possible eukaryotic cells are also retrieved.

The foregut

In *V. sulfuris*, the foregut is lined by a cuticle and consists of an oesophagus and a stomach. The latter is subdivided into three parts: an anterior cardiac region acting in food trituration, a median-posterior pyloric region of filtration and a posterior connecting tube or funnel region. The funnel region takes the form of a simple tube, devoid of setae. The cardiac stomach is separated from the pyloric chamber by epithelial ridges and linear arrangement of setae, Fig. 3A-B). The pyloric stomach is separated into dorsal and ventral chambers by interlocking setae of the ventro-lateral ridge. In the pyloric region, the structure of the filter chamber (Fig. 3B, C) is typical of amphipods (Icely and Nott, 1984; Schmitz, 1992). The secondary filter is composed of parallel rows of comb-like filter bars of 1 μm apart (Fig. 3C). The setae are Y-shaped and bear two rows of setules that overlap with those from adjacent setae. The width of the slits between the setules is about 0.06 μm (Fig. 3C-D). The filtration channels terminate at the entrance of the ventral digestive caeca. The stomach of *V. sulfuris* exhibits no atypical feature by comparison with others amphipod species and the occurrence of epimural or symbiotic bacteria has not been observed in this region.

The midgut and caeca

With the digestive glands (caeca), the midgut or mesenteron is the main zone dealing with digestion and absorption processes of nutrients. Its main structural features are the elaboration of the epithelial surface into numerous microvilli and the lack of cuticular covering. The midgut is lined by a typical endoderm of cuboidal epithelial cells with apical brush-border of short microvilli (about 0.1 μm length). These cells are poor in organelles, have a very large nucleus and are supported by a thick folded basal lamina. Electron microscopy observations indicate that the midgut harbors an important community of long, rod-shaped bacteria of about 0.2 μm in diameter and several μm in

length, Fig.4). This bacterial population is rather retrieved in the posterior part of the midgut. The bacteria appear as single-cell filaments lying on the microvillous brush-border of the cells. SEM and TEM micrographs suggest that they preferentially have a longitudinal orientation so that most of them appear cross-sectioned on semi-thin sections transverse to the body axis. Longitudinal sections of the bacteria show that their anterior end is curved, thinner than the filamentous part and generally inserts between microvilli of the epithelial cells. Some of the bacteria are in contact with the endodermal cell membrane (Fig. 4C-D) while their long posterior end is located in the ectoperitrophic space (Fig. 4B). In addition, observations at high magnification show the presence of numerous membrane vesicles and remains between the bacteria (Fig. 4D).

The digestive gland or hepatopancreas consists in 4 diverticules or caeca that branch ventrally at the junction between the foregut and the midgut. Each diverticule is lined by columnar epithelial cells bearing short apical microvilli. Most digestion and absorption occur in the ventral caeca where the epithelium is differentiated into R/F and B cells (Al-Mohanna and Nott, 1986). The pair of posterior caeca is posterior extension of the midgut and is rather involved in excretion and reabsorption. The observations of the different digestive caeca of *V. sulfuris* on semi-thin and ultra-thin sections respectively, have revealed the absence of bacteria in these structures.

The hindgut

In transverse sections, the hindgut or proctodeum consists of a thick folded epithelium surrounded by muscle fibers and cells (Fig. 5C). The hindgut epithelium is lined with a thin cuticle that bears short cuticular projections or spines oriented backward. The epidermal epithelial cells are columnar with a large basal nucleus and present abundant subcuticular apical infoldings. In *V. sulfuris*, some cells exhibit numerous mitochondria, larger than those found in other regions of the digestive system. At the cuticle surface, SEM and TEM observations of *V. sulfuris* hindgut reveal the presence of densely packed epimural bacteria (Fig. 5A, B and C) of one morphotype. They

appear as rod-shaped bacteria (about 0.5x3 µm length; Fig. 5D, E). They are tightly attached to the cuticle or cuticular spines (Fig. 5F) and form dense mats of cells in the grooves between the large villous folds and most of them adhere closely to the hindgut cuticle. Moreover, the bacteria are generally embedded in a dense and probably organic matrix (Fig. 5E-F),

Bacterial diversity

To identify the bacteria present in the digestive tract of *V. sulfuris*, 16S rRNA gene diversity has been analysed in the amphipod tissues after removal the external cuticle under sterile conditions. A total of 103 clone sequences were obtained (65 were amplified using primers E8F/U1492R and 40 using E338F/U1407R) and 97 sequences were analysed (sequences showing less than 300 bp were excluded). Molecular analysis of the microbial diversity shows 12 phylogenetic groups among which the phyla predominantly encountered are the *Epsilonproteobacteria* (21 % of clone sequences), the *Firmicutes* (18 %), the *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* (CFB, 14 %), the *Gammaproteobacteria* (12 %) and the *Betaproteobacteria* (12 %) (Table 1).

Overall, bacterial sequences from *V. sulfuris* seem to be specific either to symbiotic micro-organisms or to environmental free-living one (Table 2, Figure 6). Among the six clone sequences affiliated to *Alphaproteobacteria*, none seems to be clearly specific to hydrothermal ecosystems but are usually related to gut environments. Only 1 sequences is close to a deep-sea, octocoral-associated micro-organism (DQ395651, Penn *et al.*, 2006), one is close to bacteria from an insect gut (the ant *Myrmeleon mobilis* DQ163946, Dunn and Stabb, 2005) and three are related to a gut clone of *Eriocheir sinensis* (DQ856522, Li *et al.*, 2007), the Chinese mitten crab.

Similarly, none of the betaproteobacterial sequences are closely related to hydrothermal micro-organisms but 75 % clustered with clones of symbiotic bacteria from plants (maize) or crustaceans (the isopod *Asellus aquaticus* hepatopancreas clone 11 AY447042). Betaproteobacterial

clone sequences are affiliated to the *Burkholderia* genus and two out of twelve sequences are related to the gut clone R64LS (FM863753) from the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with 97 to 98 % identity (Durand *et al.*, submitted).

In both *Firmicutes* and *CFB*, a first part of the clone sequences is affiliated to sequences from microflora of mammal gut or rumen. The second part of the *Firmicutes* related sequences is close to halophile micro-organisms, with one which potentially from hydrothermal plume. These micro-organisms could be considered as ubiquitous bacteria. Other groups (*Acidobacter*, *Chloroflexi*, *Deinococcus*, *Fibrobacter*) are less represented and affiliated to environmental species.

In contrast to the previously mentioned proteobacterial groups, the clustering of *gamma*- and *epsilon*proteobacterial sequences seems to be different and mostly related to free-living bacteria encountered in hydrothermal ecosystems or bacteria associated with vent organisms. Two thirds of the *Gammaproteobacteria*-affiliated sequences clustered with bacteria associated with hydrothermal invertebrates such as *Riftia pachyptila* from the East-Pacific Rise (EPR, AY129116, Nelson et Fischer, 2000) and *Rimicaris exoculata* from the Mid-Atlantic Ridge (MAR, Durand *et al.*, submitted). Others, represented by the clone i7, were affiliated with *Rhodanobacter thiooxidans* (Lee *et al.*, 2007). With the exception of one sequence out of twenty-one which is close to *Helicobacter pylori*, the sequences affiliated to *Epsilonproteobacteria* clustered with clones retrieved in hydrothermal invertebrates such as shrimps, gastropods or worms (MAR, Central Indian Ridge or CIR and EPR) (Table 2, Figure 6). Most of the sequences (18 out of 21) and also the closest to those of *V. sulfuris*-associated microflora are related to epibiotic bacteria from EPR *Alvinellidae* such as *Paralvinella palmiformis* and *Alvinella pompejana* (respectively AJ441203, AJ441208, Alain *et al.*, 2002 and AJ431220, Cambon-Bonavita *et al.*, 2002), from *Rimicaris exoculata* (Polz and Cavanaugh, 1995 ; Durand *et al.*, submitted) or from a CIR hydrothermal gastropod (Goffredi *et al.*, 2004) .

DISCUSSION

In this study, we used a combination of microscopy and 16S rRNA gene sequence analyses to characterize two distinctive bacteria symbiosis in the digestive tract (in the midgut and hindgut) of the vent amphipod *V. sulfuris*, an abundant, vent-endemic species proliferating in the vicinity of colonies of Pompeii worm *A. pompejana*. These two distinct symbioses can be considered as typical in regard to the bacterial morphology and arrangement. Moreover, digestive content analysis reveals an abundant presence, all along the digestive tract, of cuticle fragments identified as *Alvinella* cuticle. This observation suggests the hypothesis that the diet of *V. sulfuris* could be closely related to bacterial ectosymbionts present on the body of *A. pompejana*. Molecular identification of symbiotic related bacteria by 16S rRNA gene sequencing has indicated that the bacterial community associated with the digestive system of *V. sulfuris* is composed of three major phyla: *Epsilonproteobacteria*, *Firmicutes* and *Cytophaga–Flavobacter–Bacteroides* (CFB). Phylogenetic analyses suggests that *V. sulfuris*-associated bacteria could be close to symbiotic bacteria associated with hydrothermal vent organisms and also bacteria involved in digestive symbioses.

Diet and trophic interaction

Analyses of the digestive content of different specimens of *V. sulfuris* revealed the presence of chitinous cuticular fragments, mineral particles and diatom frustules but above all the fragments of collagenous cuticle, identified as *Alvinella pompejana* cuticle prevailing all along the digestive tract. These observations could first suggest that the diet of *V. sulfuris* is detritivore but the predominance of Alvinellid cuticle pieces rather supports that the vent amphipods could find their nutritional resources directly on *Alvinella* individuals. This species has been frequently observed in association with different vent animals, but predominantly co-occurs with colonies of Pompeii worms (Vinogradov, 1993). *In situ* observations of *V. sulfuris* specimens have revealed that they are often present on the dorsal integument of *A. pompejana* specimens. Vinogradov (1993, 1995)

suggested that this amphipod species could graze directly on epibiotic bacteria present on dorsal sides of the Pompeii worm body. In the Pompeii worms, the epibiotic bacteria are entirely associated with the tube and the dorsal integument. The largest bacteria are closely associated with dorsal expansions of the integument of *A. pompejana* (Gaill and Hunt, 1991). Together with these data, our observations suggest that the amphipods could graze on epibiotic bacteria growing on the dorsal side of Pompeii worms and also ingest large pieces of the worm's tissues, probably from the dorsal expansions. The presence of intact and degraded bacteria in the stomach of *V. sulfuris* corroborates this hypothesis and the ingestion of living worm tissues is supported by the observation of intact alvinellid cuticle pieces (*i.e.* intact collagen fibers). Feeding strategy on dead *A. pompejana* individuals (*i.e.* necrophagous) could be excluded because the fragments of cuticle appeared non-degraded in the digestive content of *V. sulfuris*. Moreover, the presence of such abundant of cuticle fragments could rather be considered as refractory materials. The alvinellid epidermis consists of an epithelium which is limited distally by a cuticle composed of a network of collagenous fibers (Gaill and Hunt, 1991). *A. pompejana* possesses two abundant collagen types, which differ in composition, size, domain structures and immunological properties. Whereas the interstitial collagen is similar in morphology to the fibrillar collagen of vertebrates, the cuticular collagen is rather unusual (Pradillon and Gaill, 2007). Among the fibrillar collagens of 40 other invertebrates and vertebrates, the collagen produced by *A. pompejana* is positioned at the upper limit for melting temperature, only before that of thermostable synthetic collagens (Gaill *et al.*, 1995). Detritivores, whose food source is often refractory to digestion with low nitrogen content, are likely to benefit from symbiotic associations with gut bacteria (Harris, 1993). The prevalence of *Alvinella* cuticle all along the digestive system of *V. Sulfuris* underlines the close trophic interaction between the colonies of Pompeii worms and the vent amphipod species. For *V. sulfuris*, bacteria present in the hindgut and midgut may be involved in the degradation of ingested refractory organic compounds such as

collagen from the *Alvinella* cuticle. Considered as essential to degrade the *Alvinella* cuticle, the occurrence of these bacteria could be interpreted as advantageous for the host, suggesting therefore that their significance in term of digestive symbiosis.

Digestive bacterial symbioses

Microbial colonization of animal guts is ubiquitous and the presence of bacteria in the digestive tracts of crustacean is widespread (Bignell, 1984; Harris, 1993). The occurrence of gut microflora has been reported in molluscs, echinoderms, annelids and arthropods (see for review Harris, 1993). The significance of symbiotic relationships for the deep sea environments was not broadly recognized until the discovery of deep-sea hydrothermal vent ecosystems (Cavanaugh *et al.*, 2006; Dubilier *et al.*, 2008). There is now accumulating evidence that microbial colonization of the gut of marine invertebrates is widespread and that these interactions are mutually beneficial in terms of nutrition (Plante *et al.*, 1990; Lau *et al.*, 2002). Morphological and ultrastructural observations of the digestive system of *Ventrella sulfuris* reveal several evidences of the symbiotic interactions of gut bacteria: (i) the recurrence of the association observed in all specimens, (ii) the recurrence of the location of bacterial settlement (i.e. retrieved both in midgut and hindgut) (iii) the apparent good health of the tissues supporting these symbionts.

In arthropods and more precisely in crustaceans, the privileged area for bacterial settlement is the posterior part of the digestive tract, the hindgut, covered by a chitinous cuticle. Many publications related to insects have demonstrated that the hindgut represents a suitable habitat for bacterial colonization and therefore for symbiotic interactions (Breznak and Pankratz, 1977; Bignell *et al.*, 1984 for reviews). Permeability is probably facilitated at this site, which seems to be best developed in animals such as termites or cockroaches, in which the uptake of organic materials from the hindgut is of nutritional significance (Maddrell and Gardiner, 1980). Moreover, hindgut bacteria

do not compete with their hosts for nutrients since absorption occurs in the midgut. For marine microorganisms, it is not favorable to colonize the gut of an invertebrate instead of living in seawater, except for being protected from consumers, whereas the gut of a terrestrial invertebrate grants a more favorable environment than soil or leaf litter (Plante et al., 1990; Wang et al., 2004 ; 2007). The presence of attached bacteria is more likely to represent symbiotic associations (Harris *et al.*, 1991; Harris, 1993). So, the presence and arrangement of epimural bacteria in the hindgut of *V. sulfuris* clearly indicates that these bacteria are resident and also could be involved in nutritional exchange.

Absorption of nutrients occurs on the digestive surface of the midgut and in digestive glands. Regarding the digestive itself with the exclusion of the caeca, the midgut represents the digestive surface *sensu stricto* where the absorption of nutrients could occur. In the case of *V. sulfuris*, the midgut bacterial community inserted between microvilli is retrieved out of the peritrophic membrane, in the peritrophic space (Lehane, 1997). These bacteria could be considered as midgut residents because of their arrangement between microvilli and also because the midgut is the only part of the digestive tract not prone to molting. It suggests that the midgut bacteria could be long-time resident. Some authors (see Harris *et al.*, 1991 for review) have already observed the presence of bacteria in the midgut of crustaceans which has been interpreted more than an opportunistic or parasitic presence. In terms of attached parasites, the midgut clearly is the place with the biggest benefit and cost terms (Plante *et al.*, 1990). Because of the healthy nature of the midgut epithelium observed in *V. sulfuris*, bacteria could be rather considered as resident and probably involved in the degradation of the digestive content. According to morphological and ultrastructural observations, two groups of resident bacteria can be discriminated and are respectively retrieved in the midgut and the hindgut of *V. sulfuris*.

Both morphological observations and molecular identification of the gut bacteria by 16S rRNA genes analyses brings new arguments in favor of a digestive symbiosis in *V. sulfuris*. Different phylogenetic groups of bacteria have been identified according to their closest phylogenetic resemblances with the clones from *V. sulfuris* gut and are mainly: *Epsilonproteobacteria*, *Firmicutes*, *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* (CFB) and to a lesser extent *Gamma-* and *Betaproteobacteria*. Among these groups, two major populations of bacteria could be discriminated by their metabolism and potential role in the digestive tract. Even if FISH must be more efficient to correlate bacteria phylogenetic affiliation to their location, this methodology has not succeed with our samples whatever the conditions tested (*i.e.* non-adequate fixation of specimens). Moreover, the weak number of specimens did not allow to analyze separately the different parts of the digestive system of this amphipod species according the morphological observations previously described.

In the first population, the bacteria affiliated to *Firmicutes* and *CFB* are known to degrade organic matter, and particularly refractory polymers such as chitin and collagen (Harrington, 1996). Arthropods, which ingest recalcitrant compounds, often establish microbial associations in their digestive tract to digest polymers. This kind of relationship is well known for termites (Breznak, 1982, Chaffron and Von Mering, 2007) or the cricket *Gryllotalpa orientalis* (Oh *et al.*, 2008) for example, which are not able to hydrolyze cellulose without symbiont activities. In *V. sulfuris*, the collagen of *Alvinella* cuticles could be considered as a refractory digestible material and so its hydrolysis should require direct or indirect bacterial action through enzymatic synthesis. Hindgut absorption of short-chain fatty acids from fermentation of other small organic molecules has been demonstrated in various insects including cockroaches (Maddrell and Gardiner, 1980). So, gut bacteria associated with *V. sulfuris* affiliated to both phyla of *Firmicutes* and *CFB* could be involved in the degradation of collagen particles from *Alvinella* cuticles. It could be considered as a nutritive

symbiosis and its possible location could be the hingat. *Firmicutes* and *CFB* often contribute to vertebrate and invertebrate gut microflora, as pathogens or commensals (Worthen *et al.*, 2006, Tait *et al.*, 2007, Ley *et al.*, 2008) and they are also retrieved in hydrothermal environments (Lopez-Garcia *et al.*, 2003). Collagenolytic or proteolytic enzyme activities have already been evidenced in the bone-eating worms of the genus *Osedax* (Goffredi *et al.*, 2007). These activities are restricted to the root tissues that house symbiotic bacteria, belonging to the *Gammaproteobacteria* lineage (order *Oceanospirillales*). Even if direct correlations have not been yet established between symbiotic bacteria and collagenase production, authors suggest that collagenase might help *Osedax* to exploit complex organic carbons from the external environment. Such results reveal that these enzymatic activities exist in marine organisms and could be initiated from bacterial symbioses. In *V. sulfuris*, gammaproteobacterial-affiliated sequences clustered in two phylogenetic groups respectively affiliated with *Rhodanobacter thiooxidans* and *Psychrobacter sp.* P11-B-2 (EU016144, Xuezheng *et al.*, 2008), isolated from deep-sea sediments but none phylogenetic evidence suggests that this group could be also involved in the hydrolysis of *Alvinella* collagen particles or other refractory compounds retrieved in the bolus.

In the second bacterial population, the epsilonproteobacterial clones were mainly affiliated to hydrothermal symbionts from diverse vent fields (Table 2, Fig. 6). *V. sulfuris* clone e34 is closely related to a scaly-foot gastropod from CIR hydrothermal fields (Goffredi *et al.*, 2004), whereas clone i26 is related to a gut clone of *Rimicaris exoculata* (Durand *et al.*, submitted). This group of epsilonproteobacterial epibionts might be well established in symbiotic or mutualistic interactions with hydrothermal invertebrates. Bacteria affiliated to the *Epsilonproteobacteria* phyla are retrieved in diverse ecosystems, and so, harbor varied autotrophic metabolisms such as iron-oxidation, sulphide-oxidation or methylated compounds-oxidation. The single analysis of 16S rRNA gene sequences variation does not permit to infer a role for epsilonproteobacterial epibionts associated

with the amphipod but suggests that *V. sulfuris* clones which clustered in this group, could be specific to hydrothermal vents and considered as invertebrate-associated bacteria. This bacterial population may be involved in nutritive or detoxification relationships with its hosts, as observed in the vent shrimp *Rimicaris exoculata* (Zbinden *et al.*, 2004; Corbari *et al.*, 2008). Among the *Betaproteobacteria*, the correspondence of *V. sulfuris* clone (Fig.6, clone i57) with symbiotic bacteria of the isopod *Asellus aquaticus* could suggest the presence of bacteria in the digestive glands of *V. sulfuris*, as observed in the isopod. However, no bacteria have been observed in the caeca of the vent amphipod. This close affiliation suggests rather that this part of the identified *Betaproteobacteria* could be specific to another area where digestion occurs, such as the midgut (Kostanjsek *et al.*, 2002). This second bacterial population composed of both *Epsilonproteobacteria* and *Betaproteobacteria* could be affiliated to the resident bacteria observed in the midgut of *V. sulfuris* and could be considered as symbiotic bacteria.

Other micro-organisms associated with the gut of *V. sulfuris* (*Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Tenericutes*, *Acidobacter*, *Chloroflexi*, *Deinococcus*, *Fibrobacter*) are related to ubiquitous phylogenetic groups. They represent a small part of the amphipod-associated bacteria. These bacteria could be ingested with *Alvinella* tube particles or with cuticle fragments. Thus, they could constitute a transient gut microflora, ingested and expelled with the gut content.

CONCLUSIONS

Investigated for the first time, the biology of the amphipod *V. sulfuris* has revealed the significance of this macrofaunal species in hydrothermal ecosystems and has highlighted the close trophic relationships between endemic species such as this vent amphipod and the pompeii worm *A. pompejana*. Microscopic investigations of the gut of *V. sulfuris* bring new insights on the diet and importance of bacteria in the digestive system of hydrothermal vent animals. The presence of *A.*

pompejana cuticle fragments in the amphipod gut content suggests that *V. sulfuris* could directly feed on bacteria present on the dorsal integument of *A. pompejana*. In the light of the fact that this amphipod species lives in close associations with *Alvinella* colonies, such a diet appears very specialized. Combining morphological observations and molecular analyses, different bacterial populations have been identified: according to the background of *Firmicutes* and *CFB* phyla, this bacterial population could be assimilated to the resident and symbiotic bacteria present in the hindgut of *V. sulfuris* and could be involved in the hydrolysis of the refractory organic matter retrieved in the digestive content (cuticle fragments of *Alvinella*)

The second resident population is rather assimilated to the midgut bacteria and gathers mainly *Epsilonproteobacteria* specific to hydrothermal vents also involved in symbiotic interactions. As closely related clones, from EPR and MAR invertebrate-associated epibionts, this community could be specific to the amphipod and involved in nutritive or detoxification relationships with the host. But it is not possible to conclude on the putative role of *Epsilonproteobacteria*-affiliated epibionts without additional investigations.

Acknowledgments

The authors thank the Belgian Fund for Joint Basic Research (FRFC-Belgium, conv. n° 2.4594.07.F) for financial support and post-doctoral research grant of Dr L. Corbari at the University of Liege (Belgium). They also thank the partenariats “Hubert Curien Tournesol 2009-2010” for facilitating the exchanges between Ulg and Ifremer. The LADDER project was funded by NSF Ocean Sciences grant OCE-0424953. Special thanks to the chief scientists, J. Ledwell and S. Mills and also to the Alvin Team (Woods Hole Oceanographic Institution). The authors would also thank F. Pradillon (Jamstec, Japan) for her precious on-board help during the specimen sampling. Thanks to “Plateforme Biogenouest” for sequencing work.

The authors also wish to express their appreciation to N. Decloux (Ulg, Belgium) for her excellent technical assistance with transmission and scanning electron microscopy.

LITERATURE CITED

- Al-Mohanna, S. Y., and J. D. Nott. 1986.** B-cells and ingestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **66**:403-414.
- Alain, K., M. Olagnon, D. Desbruyères, P. A., G. Barbier, S. K. Juniper, J. Quérellou, and M.-A. Cambon-Bonavita. 2002.** Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**:463-476.
- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers, and D. Lipman. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Barnard, J. L., and C. Ingram. 1990.** Lysianassoid Amphipoda (Crustacea) from deep-sea hydrothermal vents. *Smithsonian Contrib. Zool.* **499**:1–80.
- Bellan-Santini, D. 1998.** Crustacés Amphipodes des sources hydrothermales: bilan des connaissances. *Cah. Biol. Mar.* **39**:143-152.
- Bignell, D. E. 1984.** The arthropod gut as an environment for microorganisms. Pp. 205-228 in *Invertebrate-Microbial Interactions*, J. M. Anderson, A. D. M. Rayner and D. W. H. Walton, eds. Cambridge University Press, Cambridge.
- Breznak, J. A., and H. S. Pankratz. 1977.** In situ morphology of the gut microbiota of wood-eating termites *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:406–426.
- Cambon-Bonavita, M.-A., G. Raguenes, J. Jean, P. Vincent, and J. Guezennec. 2002.** A novel polymer produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *J. Appl. Microbiol.* **93**:310-315.

- Cavanaugh, C., Z. McKiness, I. Newton, and F. Stewart. 2006.** Marine Chemosynthetic Symbioses. Pp. 475-507 in *The Prokaryotes*, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt, eds. Springer, New-York.
- Chaffron, S., and C. Von Mering. 2007.** Termites in the Woodwork. *Genome Biol* **8**:229.
- Childress, J. 1995.** Life in sulfidic environments: historical perspective and current research trends. *Am. Zool.* **35**:83–90.
- Corbari, L., M.-A. Cambon-Bonavita, M. Zbinden, F. Gaill, and P. Compère. 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.
- Drobne, D. 1995.** Bacteria adherent to the hindgut of terrestrial isopods. *Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica* **42**:45-52.
- Dubilier, N., C. Bergin, and C. Lott. 2008.** Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:725-740.
- Dunn, A. K., and E. V. Stabb. 2005.** Culture-Independent Characterization of the Microbiota of the Ant Lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8784-8794.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **30**:783-791.
- Gaill, F., and S. Hunt. 1991.** The biology of annelid worms from high temperature hydrothermal vent regions. *Rev. Aquat. Sci.* **4**:107-137.
- Gaill, F., K. Mann, H. Wiedemann, J. Engel, and R. Timpl. 1995.** Structural Comparison of Cuticle and Interstitial Collagens from Annelids Living in Shallow Sea-water and at Deep-sea Hydrothermal Vents. *J. Mol. Biol.* **246**:284-294.

- Goffredi, S., A. Jones, H. Erlich, A. Springer, and R. Vrijenhoek. 2008.** Epibiotic bacteria associated with the recently discovered Yeti crab, *Kiwa hirsuta*. *Environ. Microbiol.* **10**:2623-2634.
- Goffredi, S. K., S. B. Johnson, and R. C. Vrijenhoek. 2007.** Genetic Diversity and Potential Function of Microbial Symbionts Associated with Newly Discovered Species of Osedax Polychaete Worms. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2314-2323.
- Harrington, D. J. 1996.** Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect. Immun.* **64**:1885-1891.
- Harris, J. 1993.** The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.* **25**:195-231.
- Harris, J., L. Seiderer, and M. Lucas. 1991.** Gut microflora of two saltmarsh detritivore thalassinid prawns, *Upogebia africana* and *Callinassa kraussi*. *Microb. Ecol.* **21**:277-296.
- Johnston, M. D., D. J. Johnston, and A. M. M. Richardson. 2004.** Differences in mouthpart and digestive tract structure between 4 ecologically distinct talitrid amphipods from Tasmania. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **84**:717-726.
- Lehane, M. J. 1997.** Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* **42**:525-550.
- Lepescheux, L. 1998.** Spatial organization of collagen in annelid cuticle: order and defects. *Biol. Cell* **62**:17-31.
- Ley, R., M. Hamady, C. Lozupone, P. Turnbaugh, R. Ramey, J. Bircher, M. Shlegel, T. Tucker, M. Schrenzel, R. Knight, and J. Gordon. 2008.** Evolution of Mammals and their Gut Microbes. *Science* **320**:1647-1651.
- Li, K., W. Guan, G. Wei, B. Liu, J. Xu, L. Zhao, and Y. Zhang. 2007.** Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *J. Appl. Microbiology* **103**:675-682.

- Lopez-Garcia, P., S. Duperron, P. Philippot, J. Foriel, J. Susini, and D. Moreira. 2003.** Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* **5**:961-976.
- Maddrell, S. H. P., and B. O. C. Gardiner. 1980.** The Permeability of the Cuticular Lining of the Insect Alimentary Canal. *J. Exp. Biol.* **85**:227-237.
- Nelson, K., and C. Fisher. 2000.** Absence of cospeciation in deep-sea vestimentiferan tubeworms and their bacterial endosymbionts. *Symbiosis* **28**:1-15.
- Oh, H.-W., S.-Y. Heo, D. Kim, D.-S. Park, K. Bae, and H.-Y. Park. 2008.** Biochemical Characterization and Sequence Analysis of a Xylanase Produced by an Exo-Symbiotic Bacterium of *Gryllostalpa orientalis*, *Cellulosimicrobium* sp. HY-12. *Antonie van Leeuwenhoek* **93**:437-442.
- Ott, J., M. Bright, and S. Bulgheresi. 2004.** Marine Microbial Thiotrophic Ectosymbioses. *Oceanogr. Mar. Biol.* **42**:95-118.
- Penn, K., D. Wu, J. A. Eisen, and N. Ward. 2006.** Characterization of Bacterial Communities Associated with Deep-Sea Corals on Gulf of Alaska Seamounts. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1680-1683.
- Plante, C. J., P. A. Jumars, and J. A. Baross. 1990.** Digestive associations between marine detritivores and bacteria. *Annu. Rev. Ecol.* **21**:93-127.
- Polz, M. F., and C. M. Cavanaugh. 1995.** Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *PNAS* **92**:7232-7236.
- Pradillon, F., and F. Gaill. 2007.** Adaptation to deep-sea hydrothermal vents: some molecular and developmental aspects. *J. Mar. Sci. Technol.* **15**:37-53.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Schmitz, E. 1992.** Amphipoda. Pp. 443-528 in *Microscopic anatomy of Invertebrates* Wiley.

- Sheader, M., and C. L. Van Dover. 2007.** Temporal and spatial variation in the reproductive ecology of the vent-endemic amphipod *Ventiella sulfuris* in the eastern Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **331**:181-194.
- Sheader, M., C. L. Van Dover, and M. Thurston. 2004.** Reproductive ecology of *Bouvierella curtirama* (Amphipoda: Eusiridae) from chemically distinct vents in the Lucky Strike vent field, Mid-Atlantic Ridge. *Mar. Biol.* **144**:503-514.
- Stewart, F. J., I. L. G. Newton, and C. M. Cavanaugh. 2005.** Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic-anoxic interfaces. *Trends Microbiol.* **13**:439-448.
- Tait, E., M. Carman, and S. Sievert. 2007.** Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with Ascidiaceans in Eel Pond (Woods Hole, Massachusetts, USA). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **342**:138-146.
- Vinogradov, N. 1993.** Amphipoda (Crustacea) from thermal vents in the Eastern Pacific. *Hydrobiological Journal* **29**:77-92.
- Vinogradov, N. 1995.** Amphipods from hydrothermal vents and cold seepings on the ocean bottom. *Oceanology* **35**:69-74.
- Wang, Y. 2004.** Symbiotic bacteria in hepatopancreas (midgut glands) of isopods (Crustacea: Isopoda): phylogeny, evolution, and distribution, University of Kiel, Kiel.
- Wang, Y., A. Brune, and M. Zimmer. 2007.** Bacterial symbionts in the hepatopancreas of isopods: diversity and environmental transmission. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**:141-152.
- Worthen, P., C. Gode, and J. Graf. 2006.** Culture-Independent Characterization of the Digestive-Tract Microbiota of the Medicinal Leech Reveals a Tripartite Symbiosis. *Appl. Env. Microbiol.* **72**:4775-4781.
- Xuezheng, L., G. Aiguo, and C. Haowen. 2008.** Isolation and phylogenetic analysis of cultivable manganese bacteria in sediments from the Arctic Ocean. *Acta Ecologica Sinica* **28**:6364-6370.

- Zbinden, M., and M.-A. Cambon-Bonavita. 2003.** Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**:23-30.
- Zbinden, M., N. Le Bris, F. Gaill, and P. Compère. 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., B. Shillito, N. Le Bris, C. de Villardi de Montlaur, E. Roussel, F. Guyot, F. Gaill, and M.-A. Cambon-Bonavita. 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.

Phylogenetic groups	Nb of clones
<i>Epsilonproteobacteria</i>	21
Firmicutes	18
CFB	14
<i>Gammaproteobacteria</i>	12
<i>Betaproteobacteria</i>	12
<i>Actinobacteria</i>	7
<i>Alphaproteobacteria</i>	6
Tenericutes	3
Acidobacter	1
Chloroflexi	1
<i>Deinococcus</i>	1
Fibrobacter	1
Total	97

Table 1. Number of bacterial 16S rRNA gene clones from *Ventrella sulfuris* specimens (n= 3)

Phylogenetic group	Representative clone sequences	Closest match (accession no.)	Similarity
<i>Proteobacteria</i>			
<i>Epsilonproteobacteria</i>	i26	Clone IIB112 (AM268719)	99 %
		Hydrothermal vent gastropod clone SF_C23-G9 (AY531572)	97 %
<i>Gammaproteobacteria</i>	e34	Hydrothermal vent gastropod clone SF_C23-C6_shell (AY531602)	96 %
	i7	<i>Frateuria</i> sp. DM-HM (DQ419968)	99 %
		<i>Rhodanobacter thiooxydans</i> (AB286179)	98 %
<i>Betaproteobacteria</i>	i28	<i>Psychrobacter</i> sp. P11-B-2 (EU016144)	99 %
	i5	Iron-reducing bacterium clone HN4 (FJ269046)	99 %
	i54	<i>Pelomonas saccharophila</i> (AM501432)	99 %
<i>Alphaproteobacteria</i>	i57	<i>Asellus aquaticus</i> hepatopancreas clone 11 (AY447042)	99 %
	i8	<i>Eriocheir sinensis</i> gut clone C2Q (DQ856522)	94 %
	i32	Bacterium clone 015C-B05 (AY662021)	92 %
	i71	Bacterium clone Gsoil 264 (AB245345)	99 %
	e13	<i>Hyphomicrobiaceae</i> clone Amb_16S_929 (EF018645)	97 %
	e72	<i>Brevundimonas</i> sp. 7_4V (EF540478)	99 %
<i>Firmicutes</i>			
<i>CFB</i>	i64	<i>Alkalibacterium putridalgicola</i> (AB294170)	100 %
	e17	<i>Ovis ammon</i> gut clone AS2_aao35b10 (EU465772)	97 %
	e36	Bovine rumen clone 1103200832524 (EU845714)	99 %
	e45	Mouse cecum clone 16saw39-1f01.w2k (EF604607)	96 %
	e60	Rumen bacterium clone GRC56 (DQ673521)	96 %
	e75	<i>Potamochoerus porcus</i> gut clone RRH_aaa01c03 (EU474931)	95 %
	e79	Tidal sediment clone TfC20H82 (EU362236)	99 %
<i>Actinobacteria</i>	e35	Sediment clone ORSATC_h06 (EF393146)	99 %
	e61	<i>Equus asinus</i> gut clone WA_aaa03g03 (EU779398)	91 %
	e82	<i>Equus grevyi</i> gut clone GZ_aaa03a09 (EU470441)	93 %
	e84	<i>Elephas maximus</i> gut clone AE1_aaa04c09 (EU471567)	93 %
	e86	<i>Equus equus</i> gut clone horsem_aai95a09 (EU463500)	97 %
	e95	Bacterium clone 060C09_B_SD_P93 (CR933312)	92 %
	e27	<i>Gordonia</i> sp. D2 (DQ787430)	97 %
<i>Tenericutes</i>	e59, e88	<i>Knoellia subterranea</i> strain HKI 0120 (AJ294413)	97-98 %
<i>Acidobacter</i>	i70	Kiwa hirsuta epibiont clone F8 (EU265798)	96 %
	e43	Bovine rumen clone 1103200843512 (EU844544)	99 %
<i>Chloroflexi</i>	e23r	Sludge bacterium clone S6 (AF234751)	95 %
<i>Deinococcus</i>	e99r	<i>Pachnoda ephippiata</i> midgut clone PeM11 (AJ576402)	96 %
<i>Fibrobacter</i>	e51r	Denitrifying consortium bacterium clone OTU_23 (EU083501)	96 %
	e92	<i>Equus grevyi</i> gut clone GZ_aaa01b11 (EU470410)	94 %

Table 2. Closest match between representative 16S rRNA gene clone sequences from *Venttiella sulfuris* and sequences from genbank, based on the BLAST search engine.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Ventiella sulfuris*. General view (A) and morphology of the digestive system (B), which is composed of three main regions (from front to back): the foregut, the midgut and the hindgut. Scheme adapted from Barnard and Ingram (1990).

Figure 2: Digestive content. A. TEM micrograph illustrating the main features of the gut content: diatom frustules (d), mineral particles (mp) and Alvinellid cuticle (ac). B. TEM general view of the massive presence of *Alvinella pompejana* cuticle in the content. C. Details of the *Alvinella* cuticle characterized by the large intermixed collagen fibers. D. TEM view of the stomachal content with presence of intact or degraded bacteria and eukaryotic cellular fragments.

Figure 3: Foregut. A. SEM picture of the stomach. B. Semi-thin cross-sections of both cardiac stomach (CS) and pyloric chamber (PC) with filter membranes. C. Detailed view of primary filter (PF) and secondary filter (SF) in the pyloric chamber. TEM micrograph of the secondary filter showing typical Y-shaped setae.

Figure 4: Midgut. A. General SEM view of the midgut. Bacteria are visible between microvilli. B. TEM micrograph of the epithelial cells of the midgut illustrating the large density of bacteria present in the ectoperitrophic space, between the gut content and the midgut wall. C-D. TEM micrographs of the general arrangement of bacteria on and between the microvilli.

Figure 5: Hindgut. A-B. General SEM views of the hindgut, massively colonised by rod-shaped bacteria. C. Semi-thin cross section in the hindgut exhibiting a dense bacterial layer (bl), visible at

low magnification. D. TEM view of the density of bacteria. E. TEM micrograph of bacteria embedded in a mucus layer. F. Bacterial anchorage on the cuticular spines (cs) of the hindgut.

Figure 6: Phylogenetic trees based on proteobacterial 16S rRNA gene sequences from *Ventrella sulfuris* bacterial clones from EPR hydrothermal fields. In circles, the number of clone sequences affiliated to the group.

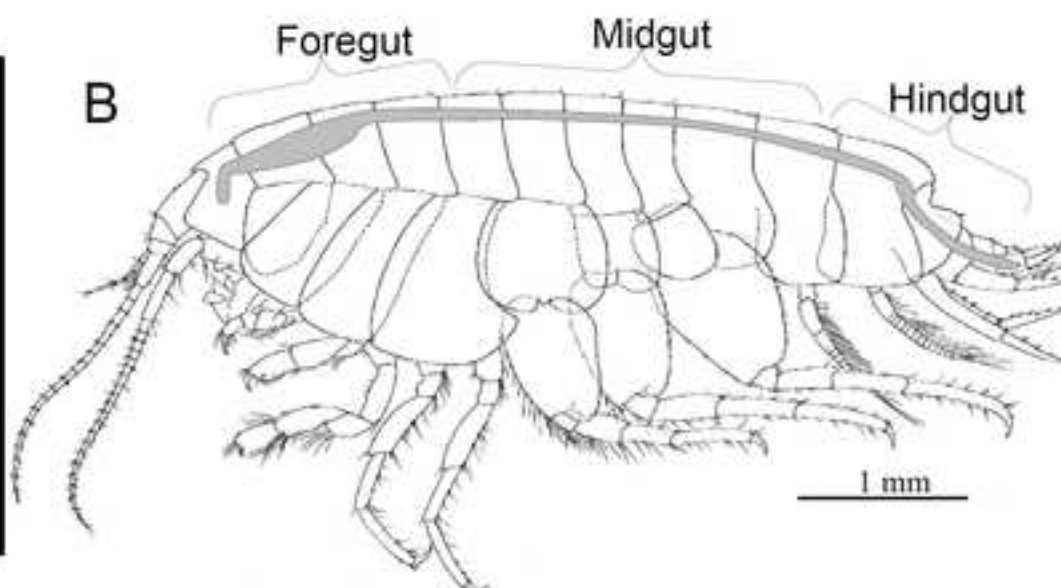


Figure2
[Click here to download high resolution image](#)

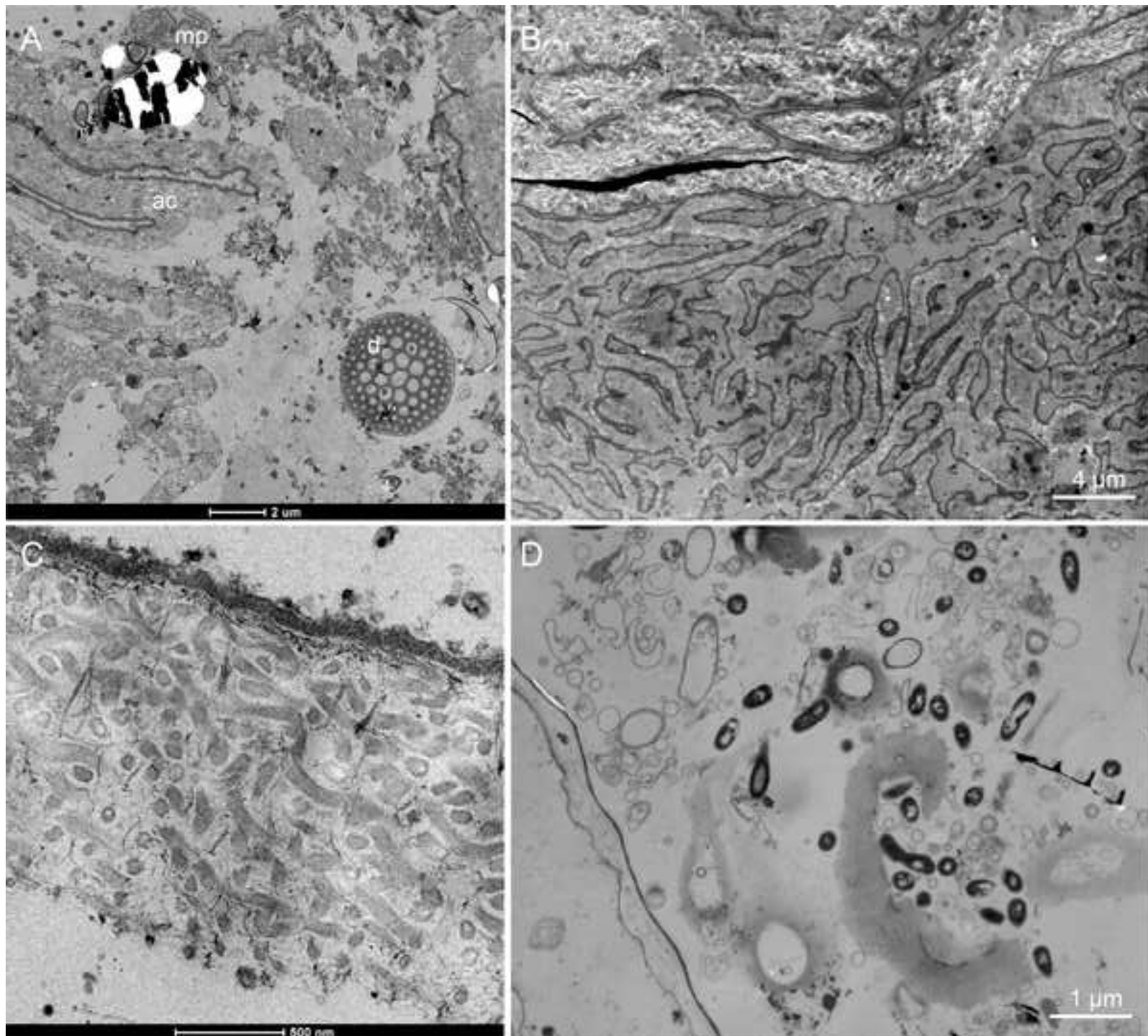


Figure3
[Click here to download high resolution image](#)

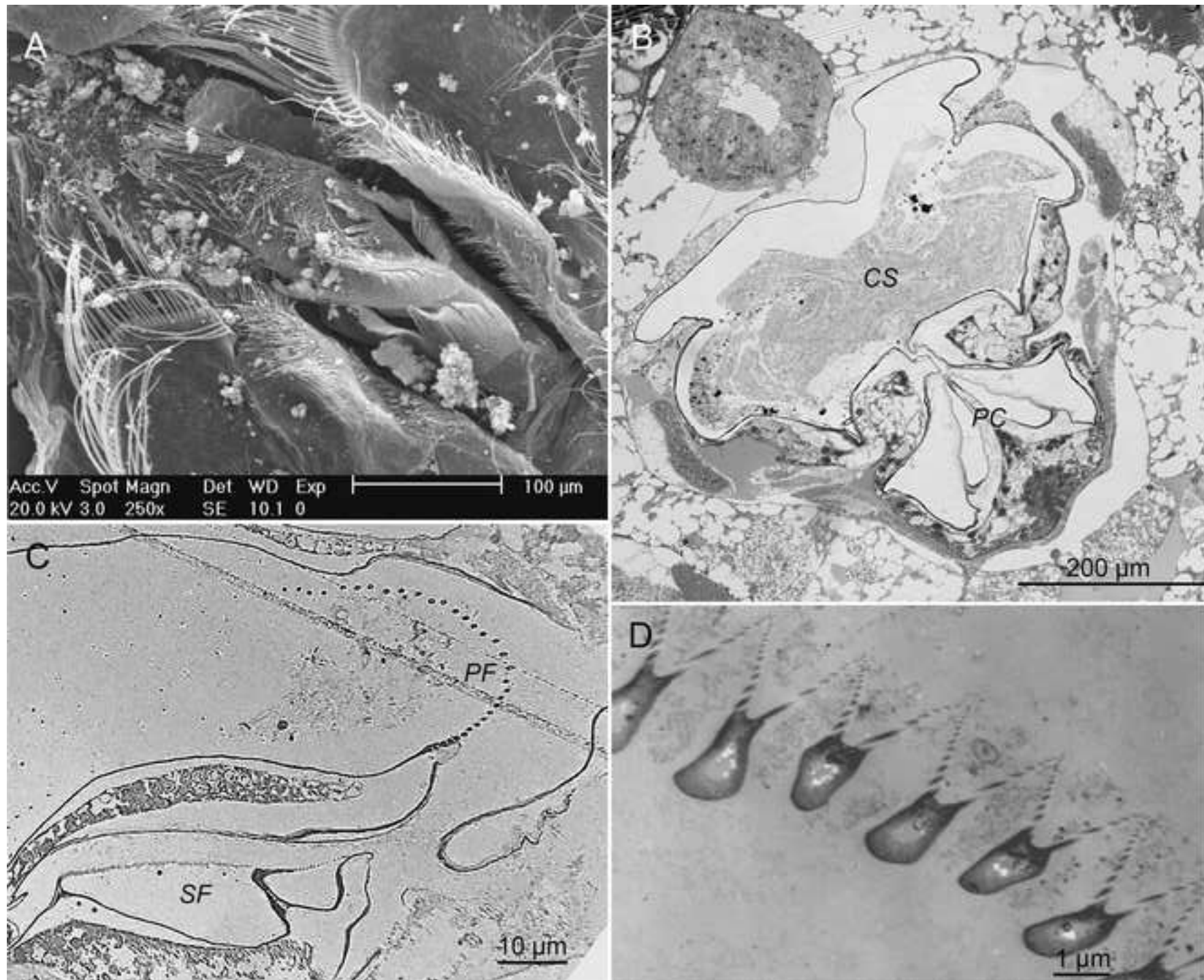


Figure4
[Click here to download high resolution image](#)

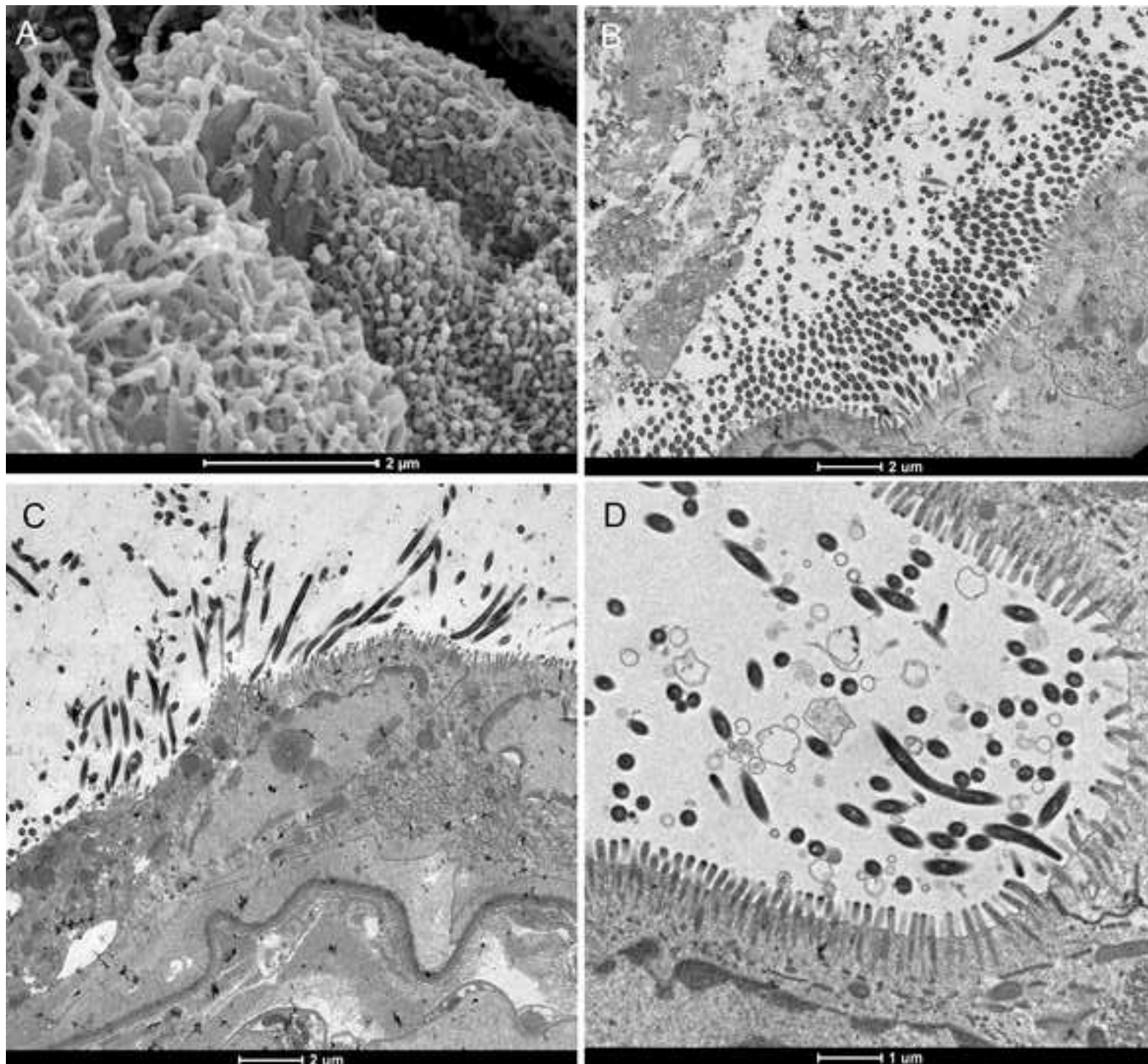


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

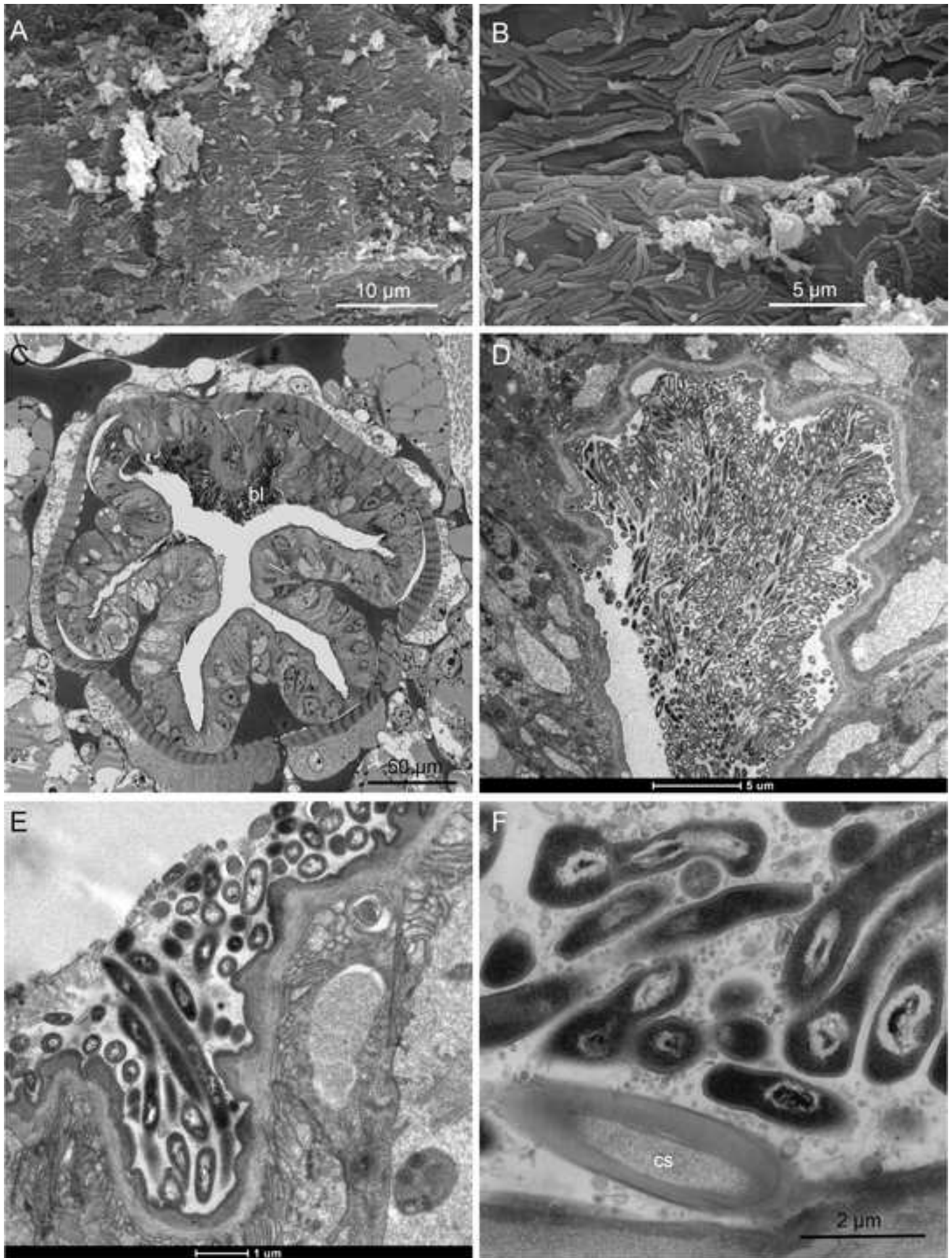
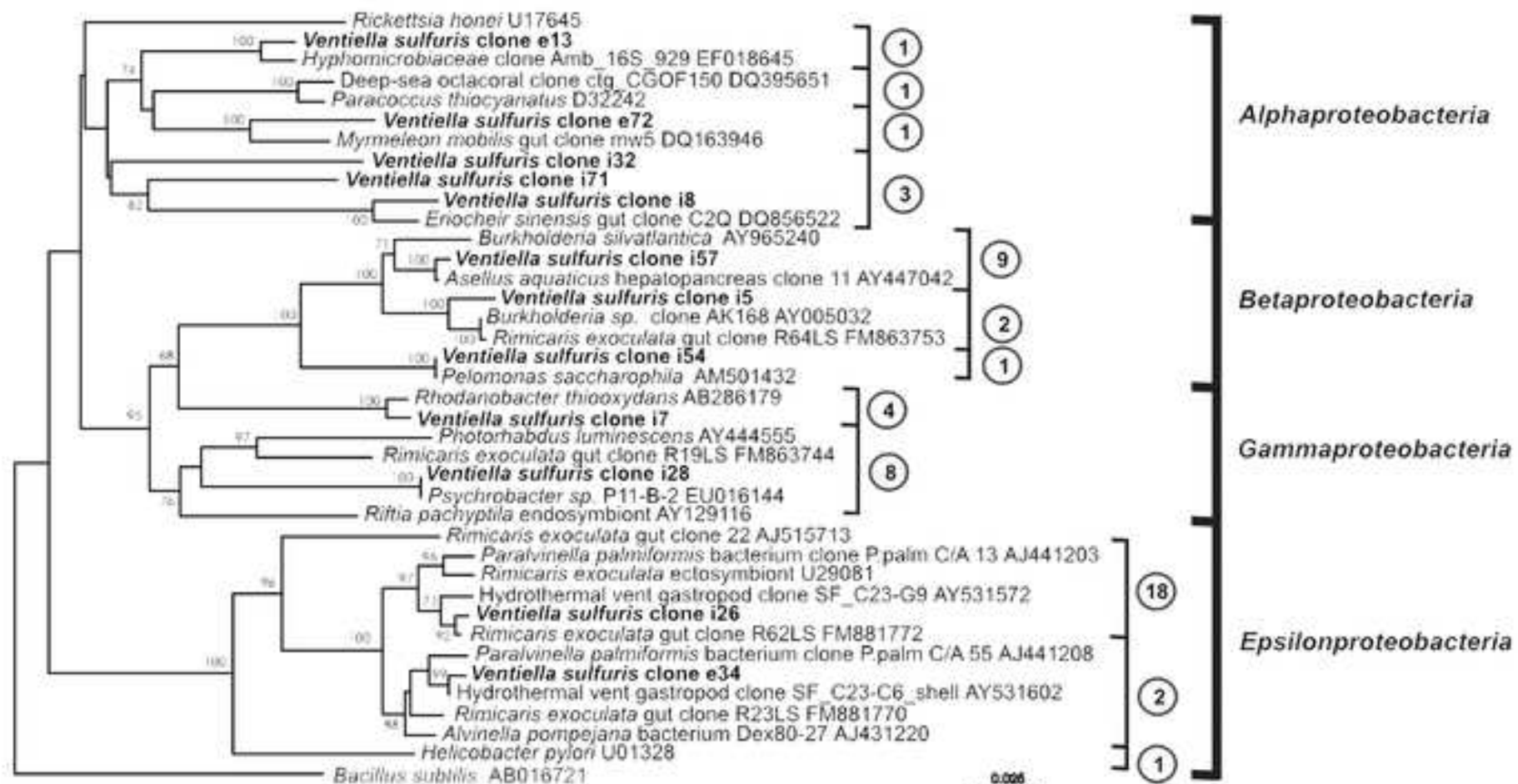


Figure6

[Click here to download high resolution image](#)



2.2 - Conclusions de cette étude

Rappel des principaux résultats - Les observations microscopiques ont révélé la présence de nombreux fragments de cuticule d'*A. pompejana* dans le contenu digestif de *V. sulfuris*. Il est alors suggéré que l'amphipode pourrait se nourrir directement des micro-organismes épibiontes du tégument dorsal des vers de Pompéi avec lesquels il vit en étroite association. Les observations microscopiques ont aussi mis en évidence pour la première fois, l'existence de deux épibioses distinctes dans le tractus digestif du crustacé. L'analyse moléculaire de la diversité de la communauté microbienne associée à l'hôte montre la présence de plusieurs groupes bactériens, ce qui confirme les observations microscopiques des épibiontes intestinaux présentant différentes morphologies.

Les groupes bactériens mis en évidence pourraient représenter une population intestinale allochtone ingérée avec les particules alimentaires et une population autochtone. Les micro-organismes résidents pourraient avoir un rôle trophique pour l'hôte : les épibiontes affiliés aux *Firmicutes* et aux *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* pourraient être impliqués dans l'hydrolyse de la matière organique réfractaire retrouvée dans le contenu digestif, telle que le collagène composant la cuticule des alvinelles. Les épibiontes affiliés aux *Epsilonproteobacteria* représenteraient également une population spécifique du tractus digestif de l'hôte mais dont le rôle n'est pas connu. Peut-être ont-ils un rôle trophique et/ou de détoxification.

L'étude de *V. sulfuris* a donc complété les connaissances sur la biologie de cette espèce et les relations trophiques qu'elle entretient avec le ver *A. pompejana*. Cependant, l'analyse du microbiote intestinal demeure incomplète.

Expériences complémentaires - Les groupes microbiens mis en évidence n'ont pas pu être identifiés par hybridations *in situ* en fluorescence faute de matériel adéquat. Nous disposons de peu de spécimens, tous fixés au glutaraldéhyde au cours de la campagne océanographique LADDER II, pour des observations en microscopie électronique. Les hybridations *in situ* réalisées sur ces spécimens n'ont pas permis de conclure de façon formelle. En effet, le glutaraldéhyde provoque un bruit de fond lors des observations dû à une auto-fluorescence du composé ou à une fixation aspécifique des sondes. Il n'est donc pas possible de distinguer la fluorescence spécifique, correspondant à un signal positif, de la fluorescence aspécifique, correspondant à un signal faussement positif.

La collecte de nouveaux spécimens permettant de compléter cette étude est donc nécessaire. Cela aurait pour but de conditionner des échantillons pour des analyses moléculaires complémentaires mais surtout pour effectuer des hybridations *in situ* permettant de localiser et d'identifier les micro-organismes impliqués dans les épibioses intestinales. Ainsi, il sera possible d'aller plus loin dans la

description et la compréhension de ce modèle. La collecte de nouveaux spécimens pourra être effectuée lors de la campagne océanographique MESCAL, prévue courant 2010, sur la ride est-Pacifique.

Chapitre II

**Biogéographie des épibiontes
associés au tractus digestif
de *Rimicaris exoculata***

CHAPITRE II

BIOGEOGRAPHIE DES EPIBIONTES ASSOCIES AU TRACTUS DIGESTIF DE *RIMICARIS EXOCULATA*

1 - “Biogeographical distribution of the *Rimicaris exoculata* gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge” Durand et al., *in prep.*

1.1- Introduction de l'étude



Etat de l'art – Les écosystèmes hydrothermaux marins profonds sont décrits le long des dorsales médio océaniques. Ils sont caractérisés par des conditions géochimiques variées qui dépendent de la nature des roches traversées par les fluides. La ride médio Atlantique (MAR) est un bon exemple de cette diversité géochimique. Les sites hydrothermaux sont retrouvés depuis le point triple des Açores (38°N, point de rencontre des plaques tectoniques Nord américaine, eurasienne et africaine) jusqu'au site MAR Sud (4°S) (**Fig.33A**). Le long de ce segment de la MAR, il existe différents grands types de sites hydrothermaux tels que Snake Pit, Lucky Strike et TAG situés sur un substrat basaltique et Rainbow, Logatchev, Ashadzé et South-MAR situés sur un substrat mantellique. La crevette *R. exoculata* a été identifiée sur la plupart des sites de ce segment de la MAR. La communauté épibionte associée à son tractus digestif, composée de *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilonproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*, n'a été décrite que sur deux sites : TAG et Rainbow. Le but de ce travail est d'appréhender une possible influence du site d'origine sur cette communauté microbienne et de comprendre les relations entre l'hôte et ses épibiontes. Mon étude repose sur la comparaison des communautés microbiennes du tractus digestif de *R. exoculata* collectées sur quatre sites hydrothermaux présentant des conditions géochimiques différentes (TAG, Rainbow, Logatchev et Ashadzé) au cours de différentes campagnes océanographiques (EXOMAR 2005, Serpentine 2007, MoMARDREAM-Naut 2007 et MoMAR08 2008).

Méthodologie utilisée et résultats obtenus – La composition et l'activité de la communauté épibionte du tractus digestif de *R. exoculata* ont été analysées par deux approches : une approche moléculaire basée sur des analyses de séquences ADN et ARN du gène de l'ARNr 16S, et une approche microscopique (microscopie électronique à balayage et à transmission et hybridations *in situ*). Les différentes approches ont permis d'établir la phylogéographie des communautés bactériennes résidentes et de mettre en évidence une dépendance de certains groupes d'épibiontes

au site d'origine. Les résultats permettent surtout d'inférer des hypothèses quant à l'évolution de l'association entre *R. exoculata* et ses épibiontes, ainsi qu'à son mode de transmission.



Running title: Phylogeography of the *Rimicaris exoculata* gut epibionts

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

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, 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

Corresponding author – E-mail macambon@ifremer.fr

Tel. (+33)298224756

Fax. (+33)298224757

Address: Ifremer Brest, 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 diverse epibiotic community. This shrimp ingests chimney particles and its gut houses bacterial communities. Although a trophic symbiosis has been suggested for both communities, their roles have not yet been completely resolved. This shrimp dominates the megafauna of hydrothermal ecosystems, all along the Mid-Atlantic Ridge regardless of the contrasted geochemical conditions prevailing on them. In this study we intended to analyse the possible environmental conditions influence on the distribution of this gut microbial community and its phylogenetic uniqueness. Gut microbial communities associated with *R. exoculata* specimens collected at four hydrothermal sites (Rainbow, TAG, Logatchev and Ashadzé) were analysed through a 16S rDNA and 16S rRNA survey and microscopic observations (TEM, SEM and FISH analyses). Our results indicate that the gut microbial community is restricted to the *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria* phyla regardless of the site. The filamentous bacteria inserted between the microvilli of gut epithelial cells are always observed. *In situ* hybridizations revealed they could be *Epsilonproteobacteria*. Regarding the *Deferribacteres*-affiliated sequences, a single phylotype is retrieved at these four sites but three or four *Mollicutes*-related clusters were retrieved, one being only identified on the Rainbow specimens. Network analyses indicate a different demographic history expansion between the sites and suggest that the Rainbow site colonization would be more ancient than the other ones. Hypotheses on the gut epibiont transmission way are proposed.

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

Introduction

First discovered on the Galágos Rift in the Pacific Ocean (Corliss et al., 1979), the deep-sea hydrothermal vent ecosystems are now described all along the mid-ocean ridges. These deep-sea ecosystems are sustained by the chemosynthesis driven by microorganisms in place of the photosynthesis in the photic zone. These ecosystems are characterized by contrasted geochemical conditions. The Mid-Atlantic Ridge (MAR), a slow spreading ridge, is a good example of contrasted geochemical conditions occurring among vent fields. Hydrothermal vents are known from the Azores Triple Junction (38°N-30°W) to the site South MAR (4°S-12°W). Along this segment, distinct hydrothermal vent conditions can be measured. The geochemical conditions at the active hydrothermal sites depend on the nature of the rocks crossed by the fluids. Most of the described vent fields are located on basaltic substratum which is a siliceous rock. The fluids expelled from basalt-hosted sites can reach temperatures up to 300°C and are enriched in sulphides and silica but relatively depleted in methane. This is the case for sites such as Snake Pit (23°22'N-44°57'W), Lucky Strike (37°18'N-32°16'W) and TAG (26°8'N-45°50'W). In contrast, other sites can be strongly influenced by mantle rocks mainly composed of olivines and peridotites. The fluids of ultramafic-hosted sites are enriched in hydrogen, methane, carbon monoxide, iron, calcium and abiotic long-chain hydrocarbon and relatively depleted in sulphides. This is the case for sites such as Rainbow (36°14'N-33°54'W), Logatchev (14°45'N-45°W), and the recently studied Ashadzé (13°N-44°50'W) (Charlou et al., 2002).

Hydrothermal vents harbor a dense and diverse endemic fauna which has to develop strategies to colonize new sites and so, strategies to circumvent the contrasted geochemical conditions prevailing on them. Usually the faunal assemblages are distributed in concentric areas around the vent fluid emission (Colaço et al., 2002). Anemones and gastropods are located in the low temperature environments (about 2 – 5°C) then bivalves and crustaceans (from 5 to 30°C). *Rimicaris exoculata* (Williams and Rona, 1986), a caridean shrimp, is found at the upper temperature of such zone (Schmidt et al., 2008; Ravaux et al., 2009). It lives in dense aggregates close to the active chimney walls (for review see Komai and Segonzac, 2008). This species is endemic of MAR hydrothermal vent sites. *R. exoculata* is well represented along the MAR. It is found both on basaltic- and on ultramafic-hosted vent fields. The aggregates seem to be as much active and dense whatever the site considered. One exception is the Ashadzé site where no dense aggregate has been observed but only few adults were distributed all around the active chimneys (Fabri et al., *in prep*). On this site the megafauna was not much diverse. It was limited mainly to anemones and chaetopterid polychaetes (Fouquet et al., 2008, Fabri et al., *in prep*).

A recent study showed that, on the Rainbow ultramaphic-hosted vent field, *R. exoculata* harbors a complex microbial epibiont community in the gill chamber, constituted of at least sulphur-, iron- and methane-oxidizers (Zbinden et al., 2008). These results could explain how this shrimp, harboring a multiple-metabolisms epibiosis, fit well with contrasted geochemical conditions. Another study indicated that the shrimp's epibionts located in the gill chamber were site-dependant (Petersen et al., 2009). This could be linked to the way of transmission of this epibiotic community supposed to be horizontally-transmitted after each generation and each moult.

In a previous study, we have shown that *R. exoculata* harbors a specific epibiotic bacterial community in the gut. Four main phyla have been retrieved in this community: *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilonproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* (Durand et al., 2010). Up to now, the studies of the gut bacterial community have been focused on the Rainbow vent site (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Durand et al., 2010). The transmission, from parents (vertical transmission) or from the environment (horizontal transmission), of this gut epibiont community is still not resolved. *Epsilon-* and *Gammaproteobacteria* phyla are commonly encountered in hydrothermal ecosystems but no *Deferribacteres* species, affiliated to the genus *Geovibrio* (the closest genus of *R. exoculata* gut epibionts), neither *Mollicutes* phyla have ever been reported from any hydrothermal vent environment (Lopez-Garcia, 2003; Voordeckers et al., 2008; Brazelton in press).

In order to analyze a possible influence of the site origin of the studied shrimps and to understand whether or not the gut epibiont community is site-dependant, a multi-site survey has been done, using both microscopic and molecular approaches, and comparing *R. exoculata* specimens from four MAR hydrothermal vent sites: TAG, Rainbow, Logatchev and Ashadzé.

Materials and methods

Sample collection

Samples were collected at four hydrothermal vent sites (Fig.1) on the MAR 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 (Serpentine 2007) and Ashadzé, 12°58'N-44°51'W, 4100 m depth (Serpentine 2007).

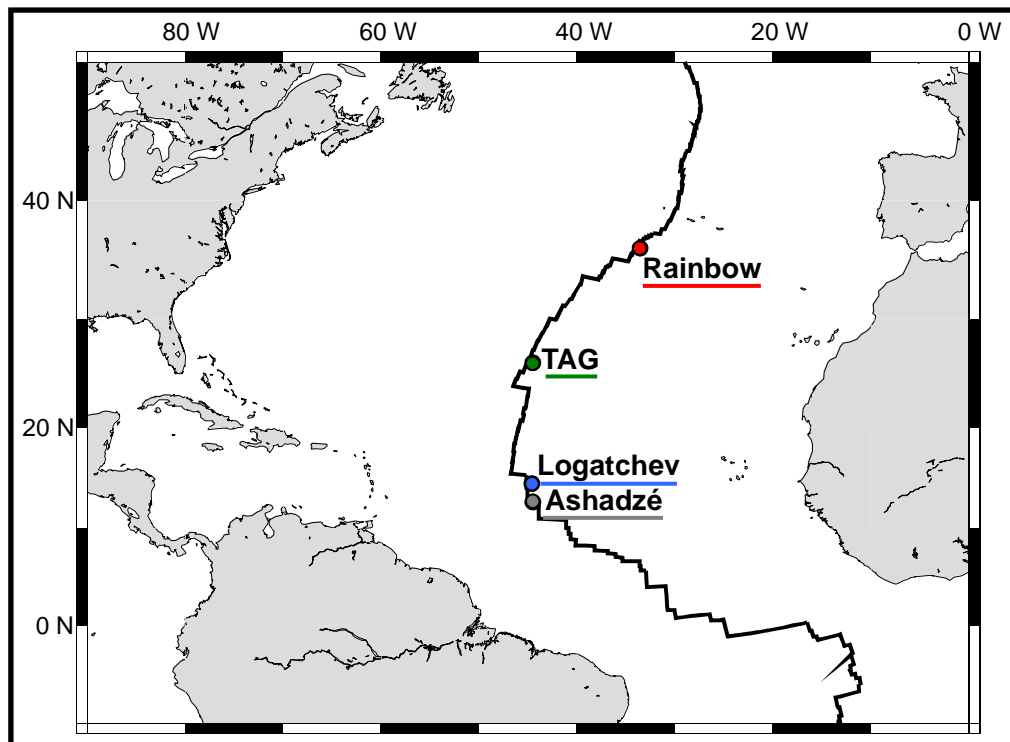


Fig.1 – Location of the four hydrothermal vent sites studied along the Mid-Atlantic Ridge (modified from the Roussel thesis 2008).

Shrimps were collected using the slurp-gun of the ROV *Victor 6000* or the DSV *Nautile*, operated from the RVs *L'Atalante* or *Pourquoi pas?*. Prior to each dive, the bowls of the slurp-gun used to collect the shrimps were aseptically washed with ethanol (96 %) before being filled with sterile seawater. Environmental samples were collected in order to check if the *R. exoculata* epibionts were present as free-living forms around the shrimp aggregates. Surrounding fluids were collected using decontaminated titanium syringe (Charlou et al., 2002) and mineral substrates (from the active chimney walls) were collected using sterilized sampling bioboxes. Before each dive the syringes were aseptically washed with ethanol 96% and sterile seawater. The bioboxes used to collect the chimney samples were aseptically

washed with ethanol 96 % and then filled with sterile seawater before each dive. Samples were treated for molecular analyses and *in situ* hybridization analyses on board.

Once on board, live shrimps were immediately dissected under sterile conditions. The sex of the specimens was not determined. Animals and environmental samples were treated for molecular analyses, microscopic observations and *in situ* hybridization analyses on board as detailed in Durand et al., 2010.

DNA extraction and PCR

DNA was extracted on board or at the laboratory on digestive tracts with the FastDNA[®] SPIN kit for soil (QBIogen, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's instructions and kept at 4°C before use. Amplification of the bacterial 16S rRNA gene was performed using universal primers E8F/U1492R (respectively 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' and 5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3', 1484 bp) or E338F/U1407R (respectively 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3' and 5'-GACGGGCGGTGWGTRCAA-3', 1069 bp) as detailed in Durand et al., 2010.

RNA extraction and PCR

RNA was extracted on board or at the laboratory on digestive tracts with the FastRNA[®] SPIN kit for soil (QBIogen, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's instructions and kept at -20°C before use. The retro-transcription of the RNA 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 approximately 20 ng RNA template in a final volume of 50 µL using the following conditions: the RNA was retro-transcribed during 1 cycle of 30 min at 50°C, then the polymerase (HotStartTaq polymerase) was activated during 15 min at 95°C and finally the cDNA was amplified as detailed in Durand et al., 2010 (with 40 cycles). Only Rainbow and Ashadzé specimens were treated.

Cloning and amplified ribosomal DNA restriction analysis

PCR products were cloned using the pGEM-T (Promega, Madison, USA) or TOPO[®] XL Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Positive clones were amplified by PCR with primers M13F/M13R (5'-GTAAAACGACGGCCA-3'/5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Amplification was performed in a final volume of 25 µL, containing 1 bacterial colony, 0.6 U GoTaq polymerase (Promega), 5 µL 5X buffer, 0.4 µM of each primer, 0.8 mM dNTP mix and 4 mM MgCl₂. Bacterial cells were first lysed during 20 min at 94°C, then DNA was amplified during 30 cycles (denaturation, 1 min at 94°C;

annealing, 1.5 min at 55°C; elongation, 2 min at 72°C) followed by 6 min for the final elongation at 72°C. The quality and purity of the PCR products was controlled after a 1% agarose gel migration. Then, DNA was hydrolysed over night at 37°C in a final volume of 20 µL. The reaction mix contained 10 µL PCR products, 4 U *Hha* I restriction enzyme (Promega), 2 µL 10X specific buffer and 0.2 µL 100X BSA. DNA fragments were then separated on a 2% agarose gel migrating for 3.5 hours at 70V. Clones were clustered according to their profile patterns. Between 1 and 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/) on an ABI prism™ 3100 GA using the Big-Dye V3.1™ Terminators technology (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) and by the society “GATC Biotech AG” (Konstanz, Germany, www.gatc-biotech.com/fr/) on an ABI 3730xl using the Dye Doexy™ Terminators technology (Applied Biosystems).

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were done on four *R. exoculata* gut clone DNA libraries (2 Rainbow pooled guts, 1 TAG, 1 Logatchev and 1 Ashadzé guts) and two RNA libraries (1 Rainbow and 1 Ashadzé guts).

Sequences were identified using the NCBI BLAST program (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) against the GenBank + EMBL + DDBJ + PDB databases (Altschul et al, 1990). 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 % similarity between each other were considered to belong to a single phylotype (OTU) and were then clustered together. Only homologous positions were included in the final alignments. Before running phylogenetic reconstruction, the best model describing the molecular evolution of sequences was inferred for each cluster of OTUs, using ModelTest version 3.7 (Posada and Crandall, 1998) with the Akaike Information Criterion (AIC). The phylogenetic reconstructions were then performed using the parameters describing the most likely model of evolution determined by Modeltest. Neighbor-joining phylogenetic analyses (Saitou and Nei, 1987) were conducted using PHYLO-WIN (Galtier et al, 1996). Maximum likelihood phylogenetic analyses (Felsenstein, 1981) were conducted using PhyML (Guindon and Gascuel, 2003) through the University of Oslo Bioportal (www.bioportal.uio.no/). Bootstrap support analyses (Felsenstein, 1985) were performed running 1000 bootstrap replicates for each data set.

In order to obtain a visual representation not constrained by the dichotomic construct of regular phylogenetic trees, other relationships between clusters of haplotypes describing

bacterial lineages of the *Deferribacteres* and of the *Mollicutes* datasets were also reconstructed and represented by a network using the software NETWORK version 4.5.1.6 (Fluxus Technology Ltd. at www.fluxus-engineering.com) with the median-joining method (Bandelt et al., 1999).

Sequences were named following the key code: site origin of the host (R = Rainbow, T = TAG, L = Logatchev and A = Ashadzé), number of the clone sequence and R for reference sample. The RNA clone sequences named were preceded by *td* (for digestive tract).

Electron microscopic observations

SEM (Scanning Electron Microscopy) and TEM (Transmission Electron Microscopy) observations were done on 1 Rainbow, 1 TAG, 1 Logatchev and 1 Ashadzé guts.

Samples were fixed as described in Durand et al., 2010. Samples for SEM 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 with a Zeiss 201 electron microscope, operating at 80 kV.

Fluorescence in situ hybridizations

In situ hybridization analyses were performed in order to confirm the presence of the gut-resident epibiont community. Samples (1 Rainbow, 1 TAG, 2 Logatchev and 1 Ashadzé guts) were prepared as described in Durand et al., 2010. The sections were hybridized during 3 hours at 46°C with a 30 % formamide buffer. All specimens were hybridized with the universal probe (Eurogentec, Liège, Belgium) Eub338 targeting the most of the *Eubacteria* (Amann et al., 1990). The specimens were also hybridized with the universal probe EPSY549 targeting the *Epsilonproteobacteria* (Lin et al., 2006). 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 software (Qimaging) or the AxioVision digital image processing software (Zeiss).

Results

Macroscopic observations

The mean size of the shrimps depended on the site they were collected on. Shrimps collected both at the Rainbow and the TAG sites were around 6 cm long while specimens from both Logatchev and Ashadzé were around 4 cm long. The specimens were at the same developmental stage (they were in the late anecdysis stage) but they were visually different. The mineral deposit on the carapace of Rainbow shrimps was red; it was grey to light red on TAG and Logatchev specimens and dark black on Ashadzé shrimps.

Fluids samples were collected at the Rainbow site. They were slightly orange-coloured and enriched in iron-oxides. The chimney samples from Rainbow were orange when collected around the shrimp aggregates and dark grey when collected under the shrimp aggregates. Chimney samples from the TAG site were black.

Microscopic observations

Scanning and transmission electron microscopic observations and fluorescence *in situ* hybridizations analyses were performed on *R. exoculata* specimens from the four hydrothermal vents sites Rainbow, TAG, Logatchev and Ashadzé. This study confirmed the presence of the midgut epibionts described before at the Rainbow and TAG sites (Durand et al., 2010) whatever the site considered (Fig.2).

The midgut of *R. exoculata* represented approximately the total length of the abdomen (Durand et al., 2010). The bacterial filaments were settled between the microvilli of the brush cells of the midgut epithelium (Fig.2 A1-B1-C1), separated of the gut content by the peritrophic membrane. They were present in dense community covering the midgut epithelium (Fig.2 A2-B2-C2). The filamentous epibionts were not observed in the stomach. The filaments harboured mostly a similar morphology regardless of the site: they were long (up to 15 μm length, some could reach more than 20 μm length) and thin (less than 0.3 μm diameter) with a light spiral-like shape. However, the structure of the epibionts of shrimps from the Ashadzé site seemed to be slightly different of the ones of shrimps from the other collected sites. They were thinner (less than 0.2 μm diameter) and seemed shorter on scanning microscopic observations. But it could be due to the depth of the site and so to the health-being of the animals: Ashadzé is the deepest of the four sites and once on board, shrimps specimens may have suffer of the decompression.

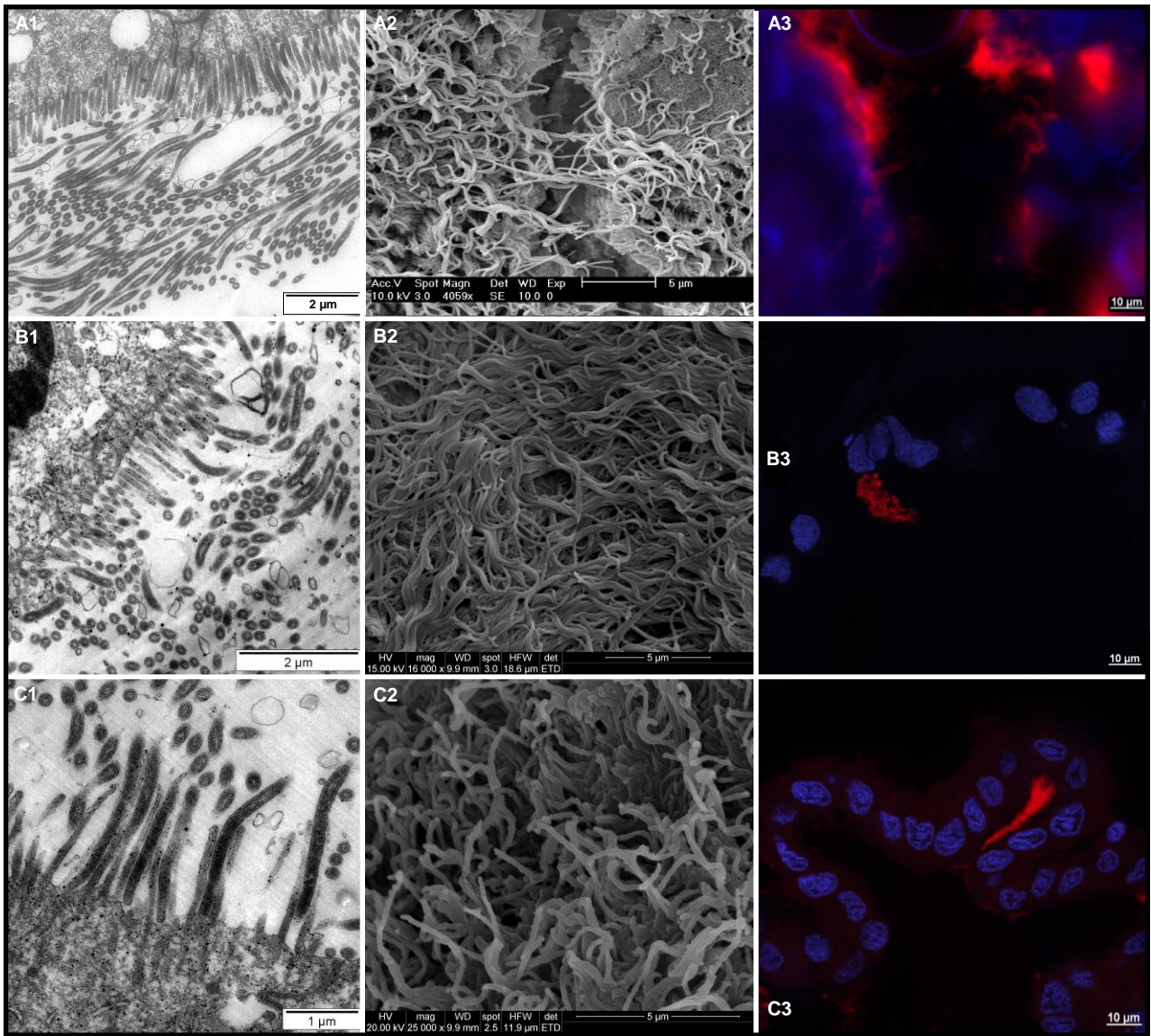


Fig.2 – *R. exoculata* gut epibionts on Rainbow (A), Logatchev (B) and Ashadzé specimens observed in transmission electron microscopy (1), scanning electron microscopy (2) and epifluorescence (3). In blue, the shrimp epithelial cells nuclei (DAPI-stained DNA). In red, the filamentous epibionts hybridized with the *Eubacteria*-specific probe Eub338 (Cy3-labelled).

A strong positive signal was obtained with the eubacterial universal probe Eub338 (Fig.2 A3-B3-C3) indicating that filamentous epibionts were active bacteria whatever the site origin. A slight positive signal was also obtained with the *Epsilonproteobacteria* universal probe EPSY549 on the Rainbow specimen (Fig.3). Therefore the filamentous epibionts may be affiliated to the *Epsilonproteobacteria*.

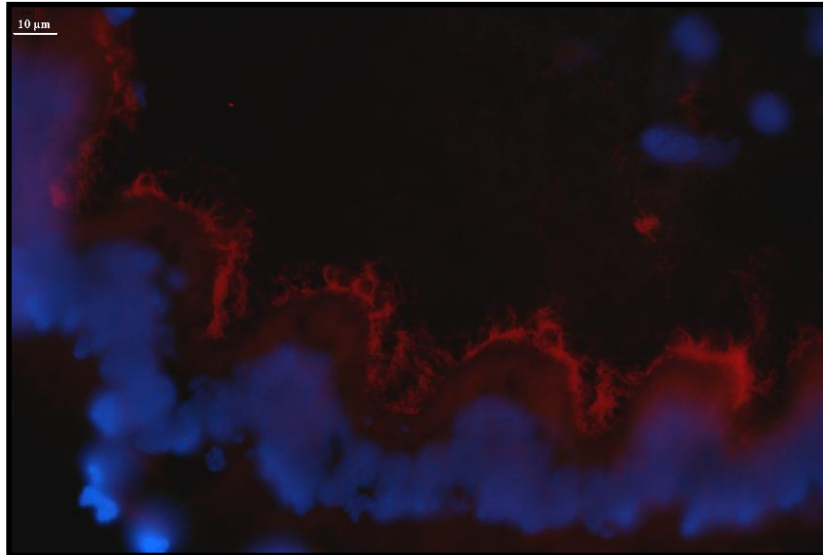


Fig.3 – *R. exoculata* gut epibionts hybridized with the *Epsilonproteobacteria*-specific probe EPSY549 (Cy3-labelled) observed in epifluorescence on a Rainbow specimen. In blue, the shrimp epithelial cells nuclei (DAPI-stained DNA). In red, the filamentous epibionts.

Environmental sequences from TAG and Rainbow sites (in progress)

A molecular survey was done on seawater sample surrounding the shrimp aggregates at the Rainbow site, as well as two chimney samples, a first one covered by orange iron-oxides and a second one, located just below the shrimp aggregates, being dark grey. One chimney sample was collected under the shrimp aggregates of the TAG site and was also dark grey. The diversity analyses of all the environmental samples revealed that *Epsilonproteobacteria* could be retrieved in each library. Most of the *Epsilonproteobacteria*-related sequences were closely related to the gill chamber epibionts clone sequences retrieved in previous studies (Zbinden et al. 2008; Petersen et al. 2009). These results support the horizontally transmission pathway for the gill chamber epibionts. In this study, as in recently published ones (Lopez-Garcia, 2003; Voordeckers et al.; 2008, Brazelton et al., in press) no *Deferribacteres* sequences related to the *Geovibrio* genus, neither *Mollicutes*-related sequences were ever retrieved. In the previous study (Durand et al., 2010), sequences related to these two groups were highly related to each other at the two sampled sites. These results reinforced the notion of a specific gut community. Other sequences were related to the *Gammaproteobacteria* group in which some of the saquences were affiliated to the methanotrophic group. Other groups were also retrieved and are ubiquitous of hydrothermal ecosystems such as *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*, *Aquificales* and other *Proteobacteria* (Voordeckers et al., 2008).

DNA and RNA analyses of the *Epsilon-* and *Gammaproteobacteria*-related gut epibionts (in progress)

The *Epsilon-* and *Gammaproteobacteria* were two of the four phyla retrieved in the resident bacterial community associated with the gut of the shrimp *R. exoculata* (Durand et al., 2010). The DNA and RNA analyses of the 16S rRNA sequences are in progress. At this stage of the study, we can confirm the previous work showing a rich species diversity for both *Epsilon-* and *Gammaproteobacteria* phyla. Most of the *Epsilonproteobacteria*-related sequences retrieved in the gut microbial community (from this study and the previous work, Durand et al., 2010) were also identified in the free-living microbial community from the seawater and the chimney samples (see above). The analyses have to be performed to establish if there was a significant site-dependence of these epibionts. However, DNA analyses showed that the *Epsilonproteobacteria* phylum was retrieved on hosts from the four hydrothermal sites while the *Gammaproteobacteria* phylum was retrieved on Rainbow specimens only. In spite this work could not be considered as quantitative, the present data of the RNA analyses indicated that the *Epsilonproteobacteria* phylum was poorly retrieved on Ashadzé specimens whereas it was the second main group on Rainbow shrimps. So, the comparison between DNA and RNA analyses data seems to highlight distinct active gut *Proteobacteria* communities regarding the site origin of the host. The *Epsilon-* and *Gammaproteobacteria* sequences from the gut samples of each site did not clustered together as it was the case for the *Deferribacteres* and the *Mollicutes*-related sequences. This result was not in a good agreement with the EPSY549 positive hybridization signal that let us suppose that the filamentous bacteria might belong to the *Epsilonproteobacteria* phyla. One hypothesis could be that the same morphology (long filamentous bacteria without septation) could correspond to several *Epsilonproteobacteria*-related species. This would suppose that these species are part of a local microbial community but that they would be influenced by environmental conditions prevailing at the sites. A second hypothesis might be that the positive signal obtained with the EPSY549 probe was not specific and so the long filamentous bacteria were related to another genus. Due to the high level of diversity among the *Epsilonproteobacteria*-related sequences, corresponding to at least one species per site, no accurate study of the geographical distribution of this cluster could be done.

DNA analyses of the *Deferribacteres* and *Mollicutes*-related gut epibionts

DNA analyses were conducted in order to compare the composition of the gut microbial community of reference specimens from diverse hydrothermal vent sites along the Mid-Atlantic Ridge. The *Deferribacteres* and *Mollicutes* phyla were not retrieved in any of the environmental samples. The diversity of the bacterial 16S rRNA gene was then studied on

406 clone sequences as detailed in Table 1. The V6 domain of the 16S rRNA is a highly variable region (Gonzalez and Labarère, 1998), considered as informative for the discrimination of *Eukaryota* species (based on the diversity of the V6 domain of the mitochondrial 16S rRNA, Uhart et al., 2007). This V6 domain is also useful for infra-species differentiation in microbiology (Sogin et al., 2006). Then, DNA analyses were completed with a detailed study of the V6 domain of the 16S rRNA gene (at the positions 984-1047 bp of the *E. coli* 16S rRNA gene) using the 124 V6 domains clone sequences available in our clone libraries.

Tab.1 – Diversity of the 16S rRNA gene and its V6 domain: 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 our Rainbow data set (they are notified in brackets).

Sites	16S rRNA gene		V6 domain of the 16S rRNA gene	
	<i>Deferribacteres</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Deferribacteres</i>	<i>Mollicutes</i>
Rainbow	22	9	20 (+2)	3 (+3)
TAG	41	5	50	5
Logatchev	41	25	13	18
Ashadzé	263	0	41	0
Total	367	39	124 (+2)	26 (+3)

In this study, all the 16S rRNA gene clone sequences affiliated to the *Deferribacteres* were closely related together (99 % similarity) and clustered in a single operational taxonomic unit (OTU) including the *R. exoculata* gut clones 62 and 91 (respectively AJ515723 and AJ515724) whatever the site considered (Fig.4). The sequences clustering in this OTU belong probably to a single species. These sequences were far related to any *Deferribacteres* described species sequences: they share ≤ 80 % similarity with the first hit of BLAST after the *R. exoculata* gut clones using the NCBI BLAST program. The topography of the trees calculated with the neighbor-joining method (HKY model) is similar to the one obtained with the maximum likelihood method (GTR model with a gamma rate characterized by an alpha parameter of 4.4 and a proportion of invariable sites 0.5) which suggest a good phylogenetic resolution.

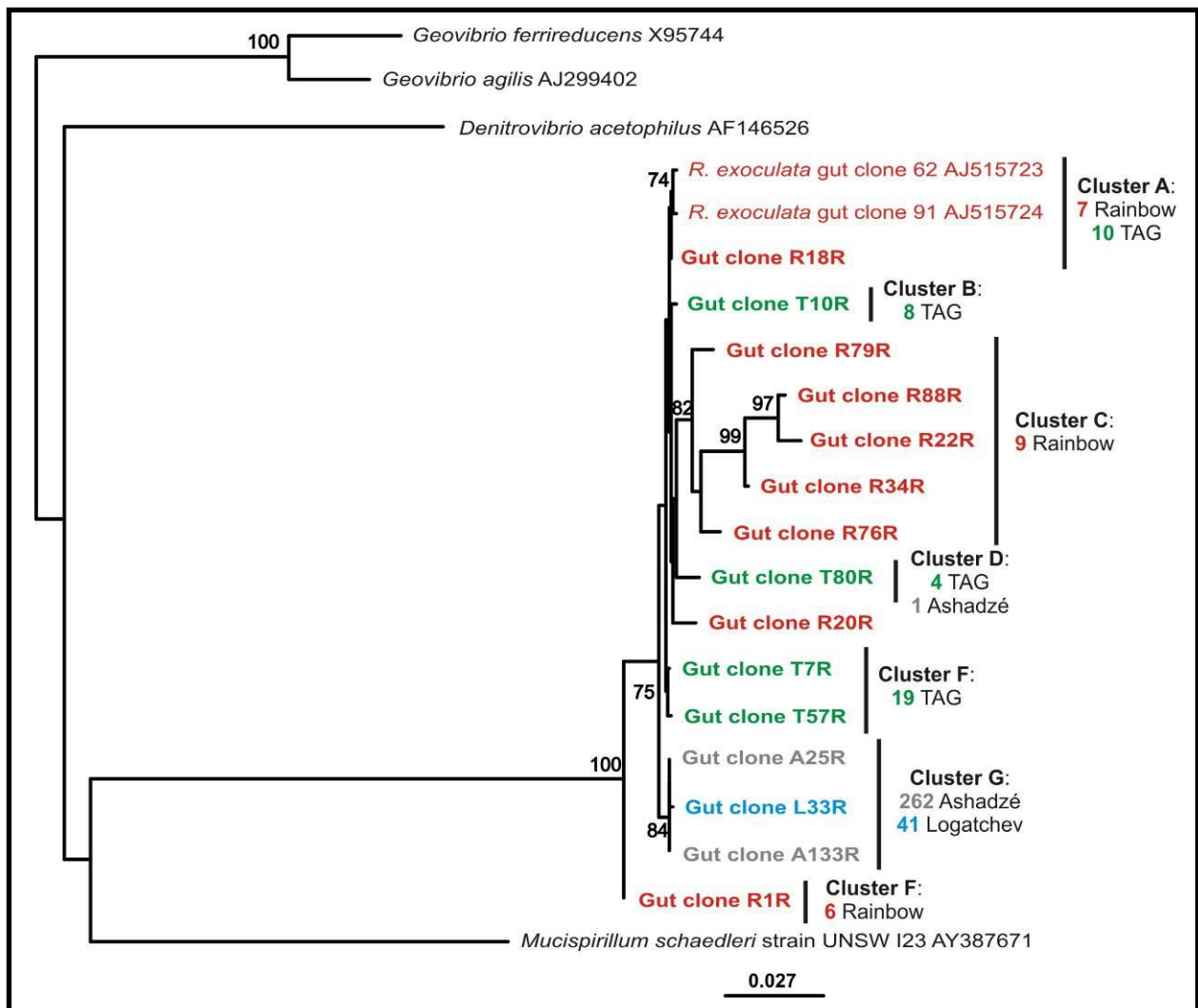


Fig.4 – Phylogenetic tree of the *Deferribacteres* 16S rRNA gene calculated on 696 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green, Logatchev in blue and Ashadzé in grey. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster.

The analyses of the V6 domain highlighted the existence of distinct haplotypes within this OTU (Fig.5). The V6 domain sequences of the *R. exoculata* epibionts were really distinct from the *Deferribacteres* described species sequences but were highly similar between them, with the exception of 1 or 2 base positions for some of them. The haplotype diversity within the OTU is determined according to the 15 variable positions out of 65, mainly equivalent to transversion mutations. Among the 126 clone sequences of *R. exoculata* gut epibionts (124 from this study and 2 from Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003), the variable positions were replaced by an adenosine (3 variable positions), a thymine (2 variable positions), a guanosine (4 variable positions), a cytosine (2 variable positions) and a guanidine or a cytosine (1 variable position) or were a deletion (3 variable positions). Variable positions showing an adenosine or a thymine replacement affected only few sequences. But the variable positions replaced by a cytosine or a guanidine affected more sequences. For

example, the cytosine mutation at the position 53 is observed on 54 sequences out of 126 and the guanidine-cytosine mutation at the position 39 is retrieved on 39 sequences of the data set. The G+C content of the genome could be an indicator of the environmental pressures. Here, an increase of the G+C could be an adaptation to temperature, hydrostatic pressure or another need to stabilize the secondary structure of the RNA such as constraints imposed by the association with the host.

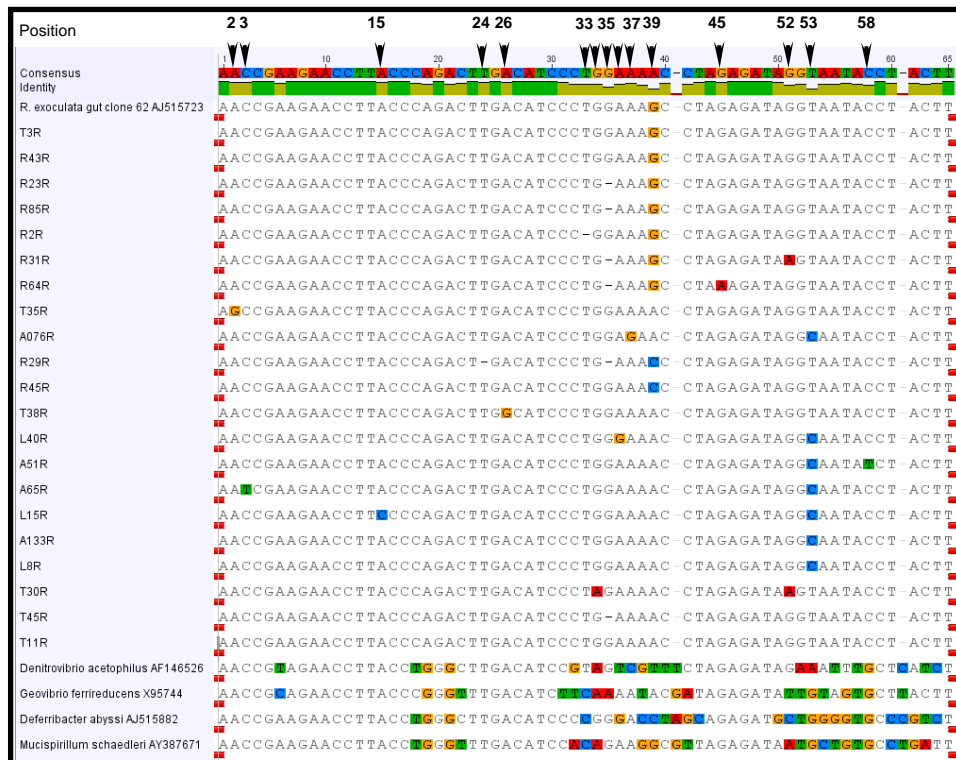


Fig.5 – Alignment of the V6 domain of the *Deferribacteres* 16S rRNA gene representing all the haplotype profiles and some of the described species. The variable positions in the sequences within the OTU represented by the *R. exoculata* gut epibionts are labelled by narrow heads.

The phylogenetic analyses of the V6 domain of the *Deferribacteres*-affiliated gut epibionts revealed a site-dependence of the haplotypes. Epibiont sequences clustered in the same three distinct groups of haplotypes (Fig.6) both in neighbor-joining (K2P model) and in maximum likelihood (K2P+G model with a gamma rate characterized by an alpha parameter of 0.5, a transition/transversion rate of 2.8 and no invariable sites). In the cluster A, only Logatchev and Ashadzé sequences were retrieved while in the cluster B, only TAG sequences clustered and in the cluster C, only Rainbow and TAG sequences were clustered.

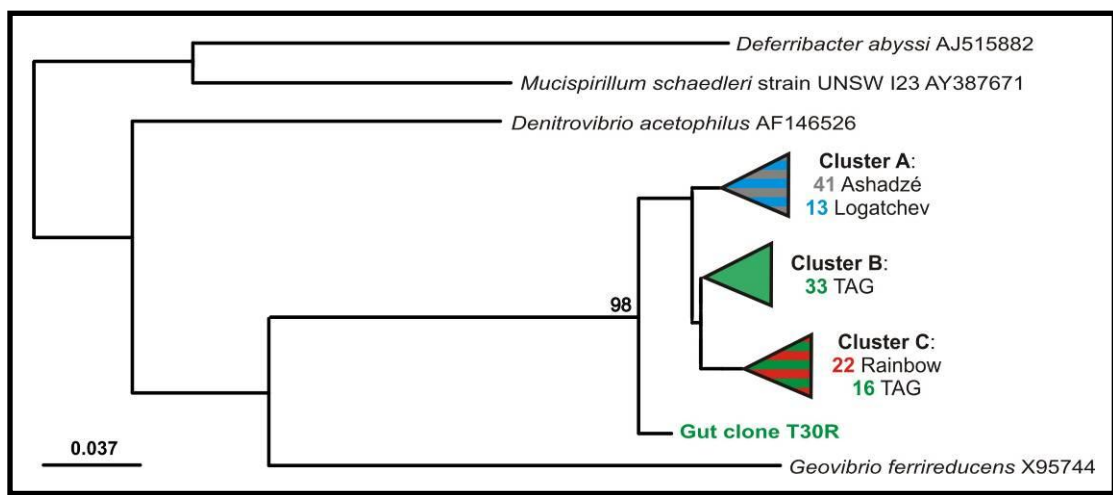


Fig.6 – Phylogenetic tree of the *Deferribacteres* V6 domain of the 16S rRNA gene calculated with the neighbor-joining method, the K2P model (Kimura, 1980) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green, Logatchev in blue and Ashadzé in grey. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster.

But usual phylogenetic approaches using the neighbor-joining and the maximum likelihood methods may be incorrect for the study of so highly related sequences (Rosello-Mora et al., 2001, Stackebrandt et al., 2002). So, the infra-specific study of epibionts sequences was completed by network calculations. Networks were estimated for the partial 16S rRNA gene, on long (695 bp) and short (303 bp) sequences (Fig.7). These network calculations are also an accurate method to analyse the genetic differentiation between the sequences and to infer genetic divergence history between the related individuals. The structure of the *Deferribacteres* epibionts communities was clearly not the same according to the site origin of the host. Logatchev and Ashadzé epibionts were represented by a star-like cluster. It is represented by a homogenous repartition of the haplotypes from both sites around the heart of the cluster comprising the majority of these sequences. This confirmed the clustering of Logatchev and Ashadzé haplotypes obtained by the phylogenetic analyses of the V6 domain using the neighbor-joining and the maximum likelihood methods. The estimation of the relationships between haplotypes of the TAG and Rainbow populations showed more complex profiles. The repartition of the sequences was scattered with a stronger segregation of the Rainbow population. There was no visible network heart for the epibionts sequences from Rainbow.

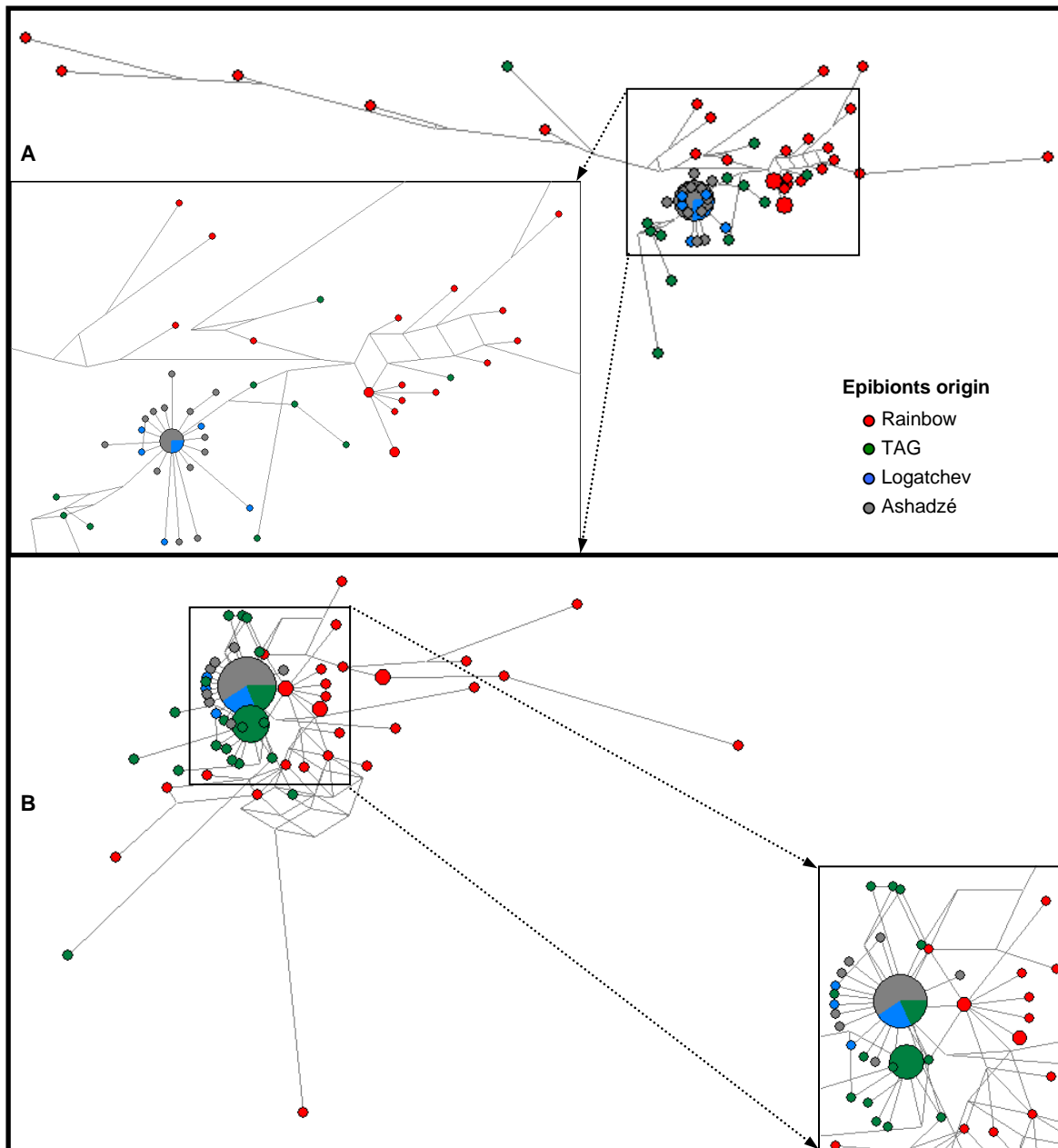


Fig.7 – Network representing the evolutive relationships of the 16S rRNA gene between the *Deferribacteres* gut epibionts according to the site origin, calculated by the median-joining method. Networks were calculated on (A) 69 sequences of 695 bp length and (B) 96 sequences of 303 bp length.

No *Mollicutes* 16S rRNA gene sequences were retrieved on the Ashadzé specimen despite the numerous clones screened. The topography of the phylogenetic trees of the 16S rRNA gene of the *Mollicutes* epibionts was the same with the neighbor-joining (HKY model) (Fig.8) and the maximum likelihood (GTR+I+G model with a gamma rate characterized by an alpha parameter of 0.7 and a proportion of invariable sites 0.3) methods. So, it strengthened the robustness of the phylogenetic reconstructions (also supported by strong bootstraps values).

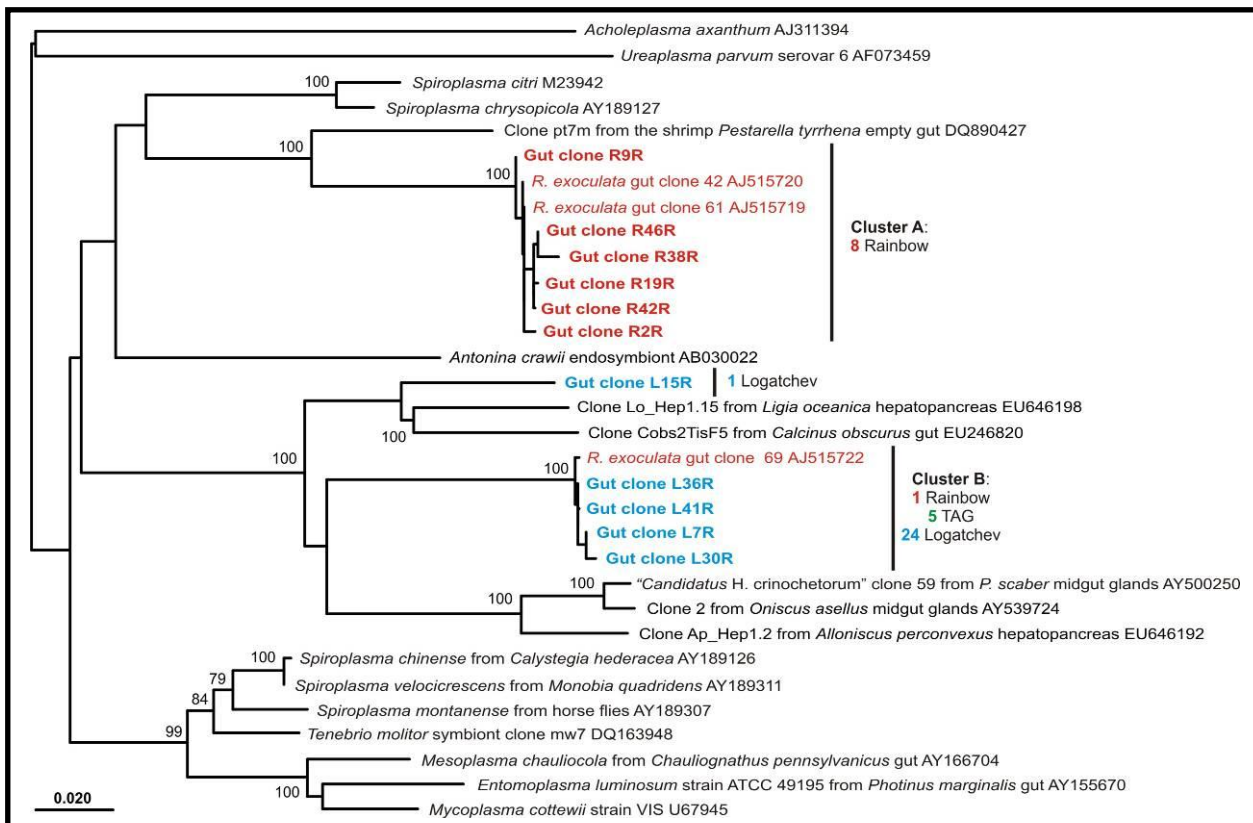


Fig.8 – Phylogenetic tree of the *Mollicutes* 16S rRNA gene calculated for a length of 762 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green and Logatchev in blue. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster.

Epibiont sequences affiliated to *Mollicutes* mainly clustered in 2 groups, sharing 98-99 % of similarity level with *R. exoculata* gut clone sequences obtained in a previous work on Rainbow specimens (clones 42, 61 and 69 from Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003). The first hit of BLAST after the *R. exoculata* gut clones using the NCBI BLAST program shared only 89 % of similarity level with sequences belonging to the cluster A (*P. tyrrhena* gut clone pt7m, DQ890427) and 87 % of similarity level with sequences belonging to the cluster B (*A. perconvexus* hepatopancreas clone Ap_Hep1.2, EU646192). Each cluster constituted a single OTU and represented probably a new species. The cluster B comprised TAG and Logatchev sequences with the exception of the reference clone 69 from the previous study whereas the cluster A was exclusively composed of Rainbow sequences.

The detailed phylogenetic analysis of the V6 domain revealed that this domain was strongly conserved within the *R. exoculata* epibionts community (Fig.9). The most variable positions were equivalent to transversion mutations. The examination of sequences revealed 6 haplotypes among clusters A and B in which 2 main profiles could be distinguished: the haplotype 1 (cluster A) represented by 4 sequences out of 29 and the other haplotypes representing the dominant profiles (Fig.9). The haplotype 1 was retrieved only on Rainbow specimens. The comparison of reference sequences haplotypes profiles and epibionts

haplotypes profiles seemed to show a favoured way for transversions replacing a guanosine by an adenosine.

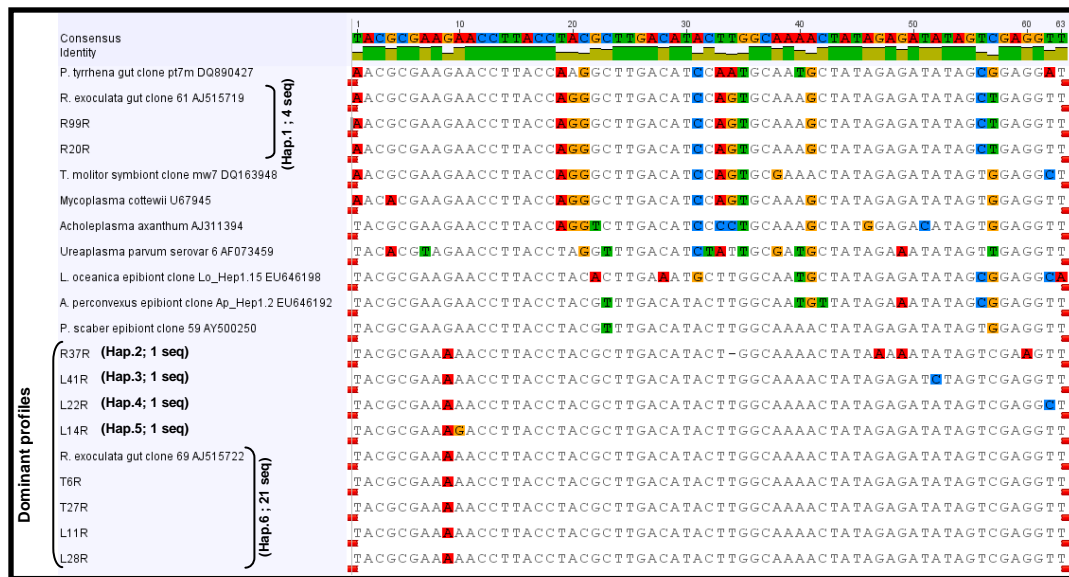


Fig.9 – Alignment of the V6 domain of the *Mollicutes* 16S rRNA gene representing all the haplotype profiles of the *R. exoculata* gut epibionts and some of the described species or clones. The name of the haplotypes and the number of sequences are notified in brackets.

The common phylogenetic approaches on the V6 domain using the neighbor-joining (K2P model, Fig.10) and the maximum likelihood (K2P model with a gamma rate characterized by an alpha parameter of 0.6, a transition/transversion rate of 2.2 and no invariable sites) methods both confirmed the dichotomy between Rainbow epibionts and both TAG and Logatchev epibionts showed with the analysis of 16S rRNA gene longer sequences (Fig.8).

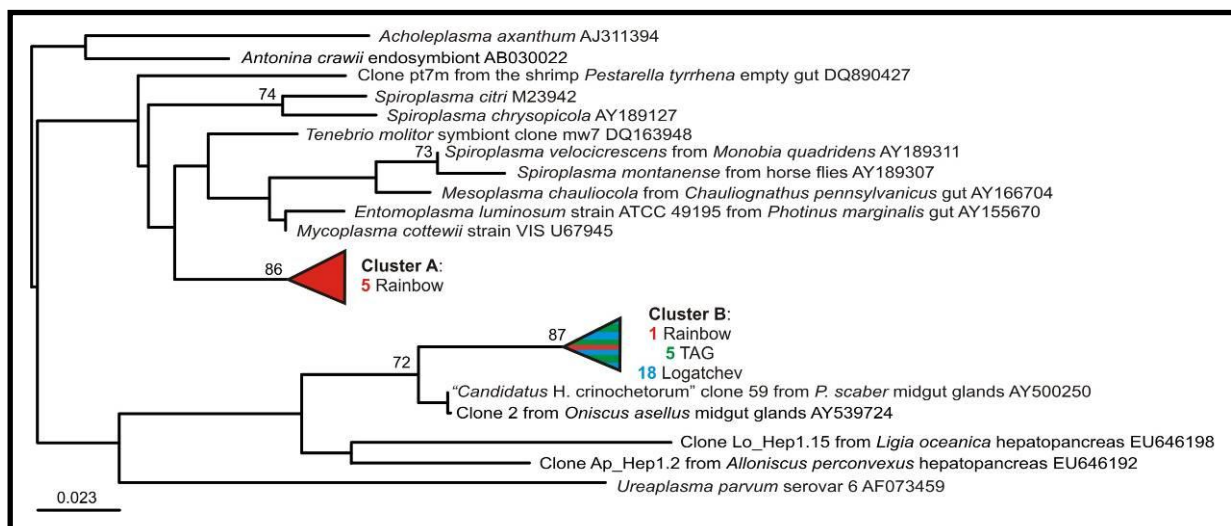


Fig.10 – Phylogenetic tree of the *Mollicutes* V6 domain of the 16S rRNA gene calculated with the neighbor-joining method, the K2P model (Kimura, 1980) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red, TAG in green and Logatchev in blue. The number of clone sequences treated is under the name of the cluster.

The construction of the networks representing the evolutive relationships of the 16S rRNA gene sequences between the gut epibionts (Fig.11) reinforced this idea showing a strong dichotomy between the cluster A and the cluster B. Whatever the number of sequences and their length, the two hearts of the networks have a distinct structure. The heart representing the cluster A (constituted of Rainbow epibionts sequences only) was scattered whereas the heart representing the cluster B (few Rainbow sequences mixed with TAG and Logatchev epibionts sequences) was a star-like cluster.

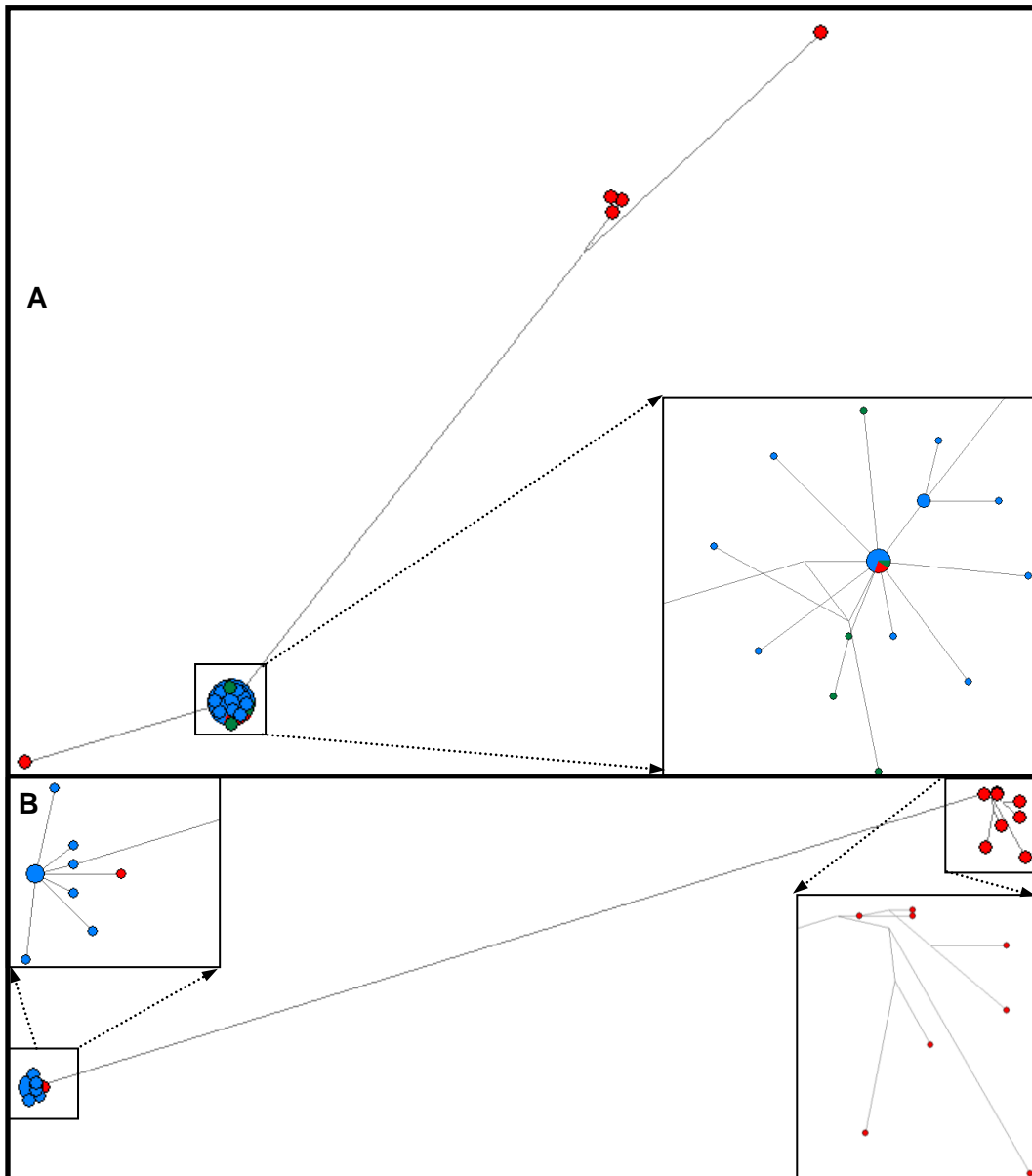


Fig.11 – Network representing the evolutive relationships of the 16S rRNA gene between the *Mollicutes* gut epibionts according to the site origin, calculated by the median-joining method. Networks were calculated on (A) 30 sequences of 491 bp length and (B) 18 sequences of 762 bp length.

Thus briefly, except for the *Mollicutes* sequences affiliated to the *R. exoculata* gut clone 69 (AJ515722), the phylogenetic analyses (phylogenetic trees and networks) revealed that

the *Deferribacteres* and the *Mollicutes* gut epibionts “species” diversity did not seem to be site-dependent in contrast with the haplotype diversity among a same “species” which seemed to be influenced by the site origin of the host. The network constructions completed this major fact indicating a probable distinct evolutive history of the *R. exoculata* epibionts of the four hydrothermal vent sites studied. For both *Deferribacteres* and *Mollicutes* phyla, the Rainbow epibionts communities seemed to be diversified within a same species whereas the Logatchev and Ashadzé communities seemed to be subjected to a more recent evolutive expansion.

RNA analyses of the *Deferribacteres*- and *Mollicutes*-related gut epibionts

The aim of the RNA analyses was to determine the active gut bacterial populations and so to infer a possible site origin effect. The 16S rRNA diversity was studied on Rainbow and Ashadzé specimens only. A total of 137 *Deferribacteres*-affiliated and 49 *Mollicutes*-affiliated clone sequences were treated. Thus, one of the most important results in the RNA analyses was to amplify *Mollicutes*-affiliated sequences whereas it had failed for all attempts in DNA analyses. An explanation could be that the specimen used for the DNA extraction was unhealthier than the one used for the RNA extraction and so its digestive tract may have been partially recovered. As only six specimens were collected from this site, we were unable to re-extract DNA from another specimen. As showed by the DNA analyses, the *Deferribacteres*-affiliated and *Mollicutes*-affiliated epibionts RNA sequences were closely related together and there was a restricted diversity (Fig. 12 and 13).

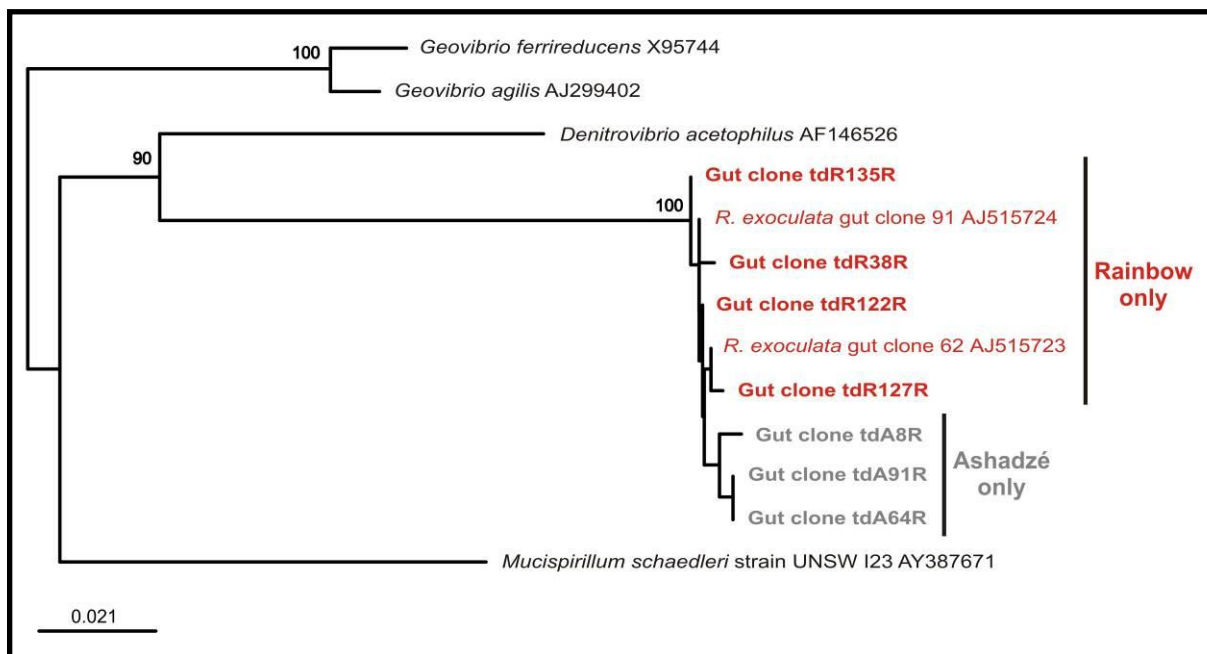


Fig.12 – Phylogenetic tree of the *Deferribacteres* 16S rRNA calculated for a length of 785 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red and Ashadzé in grey.

Clone sequences clustered in a single OTU for the *Deferribacteres*-affiliated epibionts (99 % similarity, Fig.12) and 4 groups for the *Mollicutes*-affiliated epibionts (Fig.13), supported by strong bootstraps values using the neighbor-joining (HKY model) and the maximum likelihood methods (GTR+G model with a gamma rate characterized by an alpha parameter of 0.3 and no invariable sites for the *Deferribacteres* tree and GTR+I+G model with a gamma rate characterized by an alpha parameter of 0.8 and a proportion of invariable sites 0.4 for the *Mollicutes* tree).

The detailed study of the partial *Deferribacteres* 16S rRNA sequence of the *R. exoculata* gut epibionts (785 bp aligned) revealed a very low diversity considering the few variable sites through the total sequence length among haplotypes. However, Ashadzé clone sequences seemed to cluster together, supporting DNA analyses results.

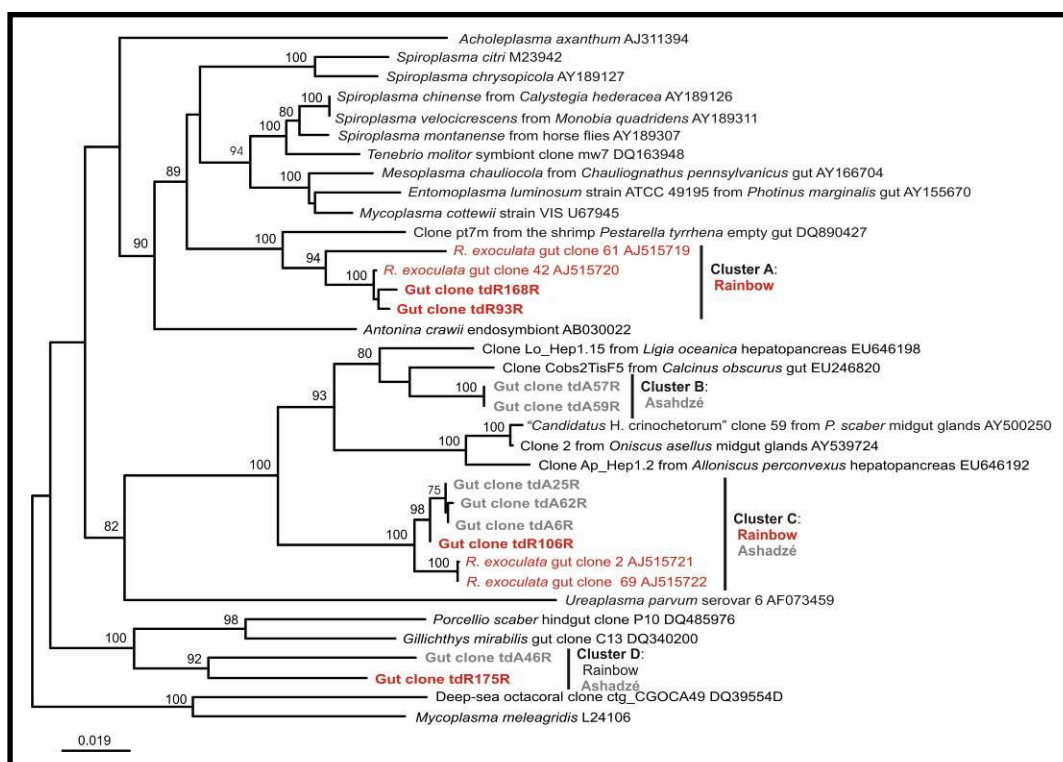


Fig.13 – Phylogenetic tree of the *Mollicutes* 16S rRNA calculated for a length of 783 bp, with the neighbor-joining method, the HKY model (Hasegawa et al., 1985) and 1000 bootstraps resampling. Epibionts sequences are labelled as follows: Rainbow in red and Ashadzé in grey.

The analysis of the *Mollicutes*-affiliated 16S rRNA highlighted similarities in comparison to the DNA analyses but some important differences too. The RNA cluster A, close to the *R. exoculata* gut clones 42 and 61 (respectively AJ515720 and AJ515719), was similar to the DNA cluster A and was also composed of Rainbow epibionts sequences exclusively. The clusters A (DNA and RNA) was then supposed to be site-dependant. The RNA cluster B, affiliated to crustaceans epibionts (clones Lo_Hep1.15 and Cobs2TisF5, respectively EU646198 and EU246820) associated with the digestive tract, was composed of Ashadzé epibionts sequences only. This group was poorly represented in the RNA analyses as well in

the DNA analyses where it was composed of a single Logatchev epibionts clone sequence. This again suggested analogies in the “species” diversity between the epibionts from the Ashadzé and the Logatchev hydrothermal sites and reinforced the hypotheses supporting the networks reconstructions based on the 16S rRNA gene sequence. The RNA cluster C was related to the *R. exoculata* gut clones 2 and 69 (respectively AJ515721 and AJ515722) as the DNA cluster B. It clustered Rainbow and Ashadzé epibionts clone sequences. Both these DNA and RNA clusters were composed of mixed sequences of epibionts from all hydrothermal sites studied. The cluster D was not retrieved in the DNA analyses. These 16S rRNA sequences were affiliated to gut clones from an isopod (*Porcellio scaber* clone P10, DQ485976) and a fish (*Gillichthys mirabilis* clone C13, DQ340200) sharing 86-88 % level of similarity. This cluster was retrieved in the previous work about the occurrence of a resident bacterial community associated with the gut of *R. exoculata* (Durand et al., 2010). The DNA epibiont sequences were retrieved from TAG and Rainbow hosts submitted to starvation experiments in a pressurized incubator. So, the RNA cluster D could be considered as a group which was not site-dependent.

Discussion

Activity and possible roles of the resident epibiotic community

This work confirmed that *Deferribacteres*, *Mollicutes* and *Epsilonproteobacteria* were the main phyla retrieved in the bacterial communities associated with the gut of the shrimp *R. exoculata*. Their distribution all along the MAR hydrothermal vent sites strengthened the hypothesis of a resident and specific bacterial community. Probably the gammaproteobacterial population is a part of the resident epibionts but DNA and RNA analyses showed that it was not a main community. According to our molecular analyses, the *Deferribacteres*-epibionts are usually the dominant and the more active population. A hypothesis would be they metabolized the iron-sulphides and/or the iron-oxides from ingested chimney particles. This activity could be a detoxification process for the host. Cuticle fragments are sometimes observed in the digestive content. The chitin and tanned proteins which compose the cuticle are biological refractory compounds. It could be difficult to digest them for animals. *Deferribacteres* are known to be strictly heterotrophic micro-organisms. They could play a complementary role in the hydrolysis of the cuticle fragments ingested and so could bring nutrients to the host and the whole epibiotic community.

Compilation of DNA and RNA analyses data indicated that *Mollicutes* were present on the four sites. These micro-organisms have usually an extremely reduced genome making them auxotrophic for many elementary compounds and often strictly dependent of a host (Maniloff and Morowitz, 1972; Razin, 1978, 1998; Clark, 1984; Regassa and Gasparich, 2006). In our symbiotic model, we have no information about their genome size. But we can hypothesize that they are probably host-dependent, as they are not found in any deep-sea environment, and maybe also epibionts-dependent. Interdependent relationships could exist between the epibionts. The gut epibiont population could be a syntrophic community living having a mutualistic association with the host *R. exoculata*.

The settlement of the filamentous epibionts and the good health of the subjacent tissues of all specimens treated suggested important relationships with the host. Their morphology and the strong hybridization signals with the *Eubacteria* universal probe also suggested an acute activity and probably numerous exchanges with the surrounding media represented by the gut, favourable for the host and/or for the epibiont themselves. Moreover, the settlement of these filamentous bacteria was clearly only located in a part of the digestive tract (the midgut) and these cells did not present any septum. This indicated a strong invasion control by the shrimp on its microbial communities.

Possible transmission pathway of the gut epibiont communities

A recent study of the epibiont communities associated with the gill chamber of *R. exoculata* showed that these bacterial populations were site-dependent (Petersen et al., 2009). These communities were composed of *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria*, closely related to environmental clones from the seawater and the chimney surrounding the shrimp aggregates and to *R. exoculata* gut clones (data not shown, work in progress). A horizontal transmission way can thus be suggested for the cephalothoracic epibionts. Probably *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria* gut epibionts are environmentally-transmitted too as they were closely related to free-living relatives.

The *Deferribacteres*-affiliated and *Mollicutes*-affiliated epibiont sequences patterns along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal sites were highly conserved among the studied *R. exoculata* specimens. This suggested a strong co-evolution between all partners of the mutualistic association (both microbial groups and the host). Except for two groups of *Mollicutes*-affiliated epibionts, the “species” diversity of the resident gut microbial community did not seem to be affected by the site origin of the host despite the physical barriers such as distance, depth and contrasted geochemical conditions. This might indicate the possibility of gene flows between epibionts populations from geographical distinct areas. The phylogeography of the host based on mitochondrial genes (Petersen et al., 2009; Texeira et al., pers. com.) revealed that there was no site-segregation of the animals suggesting significant migration and gene flows between the *R. exoculata* populations over vast geographic distances or a very recent evolutive study. The strongly conserved sequence patterns at the species level (*ie* a single OTU at 99% level of similarity) of the resident *Deferribacteres*-affiliated and *Mollicutes*-affiliated epibionts regardless of the site origin of the host seemed to strengthen this hypothesis. This underlined a strong co-evolution between the partners of this mutualistic association and so, a common dispersion history along the MAR hydrothermal vent sites. Then, together with the absence of related sequences in the free-living microbial communities (this study and others), we hypothesize that these two epibiont communities could be vertically-transmitted. Several way of vertical transmission could be suggested. (1) Epibionts could be acquired at early juvenile stages by processes 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 but no free-living *Deferribacteres*- or *Mollicutes*-affiliated epibionts were retrieved in the environmental samples. (3) Epibionts could be transmitted inside the eggs. (4) Epibionts could be transmitted with the maternal sexual cells. In both phenomena larvae would be yet colonised by the gut epibionts before they hatch and so this would give the possibility of a

common dispersion pathway. Larval stages were supposed to be pelagic forms capable of long distance dispersal (Pond et al., 1997, 2000). This argues in favour of important genes flows between both hosts and epibionts geographically distinct populations. But few studies have been reported on the *R. exoculata* larval stages because of the difficulties to retrieve them in hydrothermal ecosystems.

Influence of the host origin on the resident epibiont communities: new hypotheses about the history of the epibiont communities.

This work indicated also a possible site influence on two groups of *Mollicutes*-affiliated epibionts and on the haplotypes distribution within the *Deferribacteres* and the *Mollicutes* epibiont communities. The V6 domain phylogenetic analyses results and the networks reconstructions indicated that the genes flows between epibiont populations were important enough to mask or avoid the species speciation (according to the molecular clock specific to these populations) but also low enough to let show a site influence regarding the haplotypes considered. Taken together, our results indicated that single species occurred along the MAR but that at the sub-species level a slight diversity was observable. These results seem to indicate a recent phylogenetic divergence among the epibiont populations. The recent divergence also seems to be the case for the host (Teixera et al., pers. com.). Regarding the Rainbow site, one cluster of *Mollicutes*-affiliated epibionts sequences was specific to this site. We suggest the existence of physical and chemical factors affecting the epibionts distribution and isolating the Rainbow populations as it is suggested by the networks results. A physical factor could be the location of the Rainbow hydrothermal site on the Azorean segment of the Mid-Atlantic Ridge and on the internal side of a nodal basin (Fig.14). So, the area is protected from deep-oceanic currents. And the proximity of the Azores archipelago 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 at the Rainbow hydrothermal site could be a factor affecting the epibiont diversity at the sub-species level (haplotypes). This ultramafic-hosted site has fluids highly enriched in iron not encountered at the other sites. The gas composition of the fluids and the presence of abiotic hydrocarbons are supplementary parameters characterizing the particularity of the geochemical conditions at Rainbow. If we compare Rainbow with the three other sites, Rainbow is also the less deep site (less than 3000 m depth). The abyssal regions are considered beyond 3000 m depth. This physical parameter may be a biological barrier to life (Priede et al., 2006). Live at high depth is rare and set many pressures and requires highly specific physiological adaptations of the animals such as the lipid composition of the cells membranes, the hydrostatic pressure, the buoyancy... In the case of the mutualistic association between *R. exoculata* and the epibionts, the partners are submitted to the

pressures linked to the depth. It is possible that this biological barrier represents another factor isolating Rainbow from other sites.

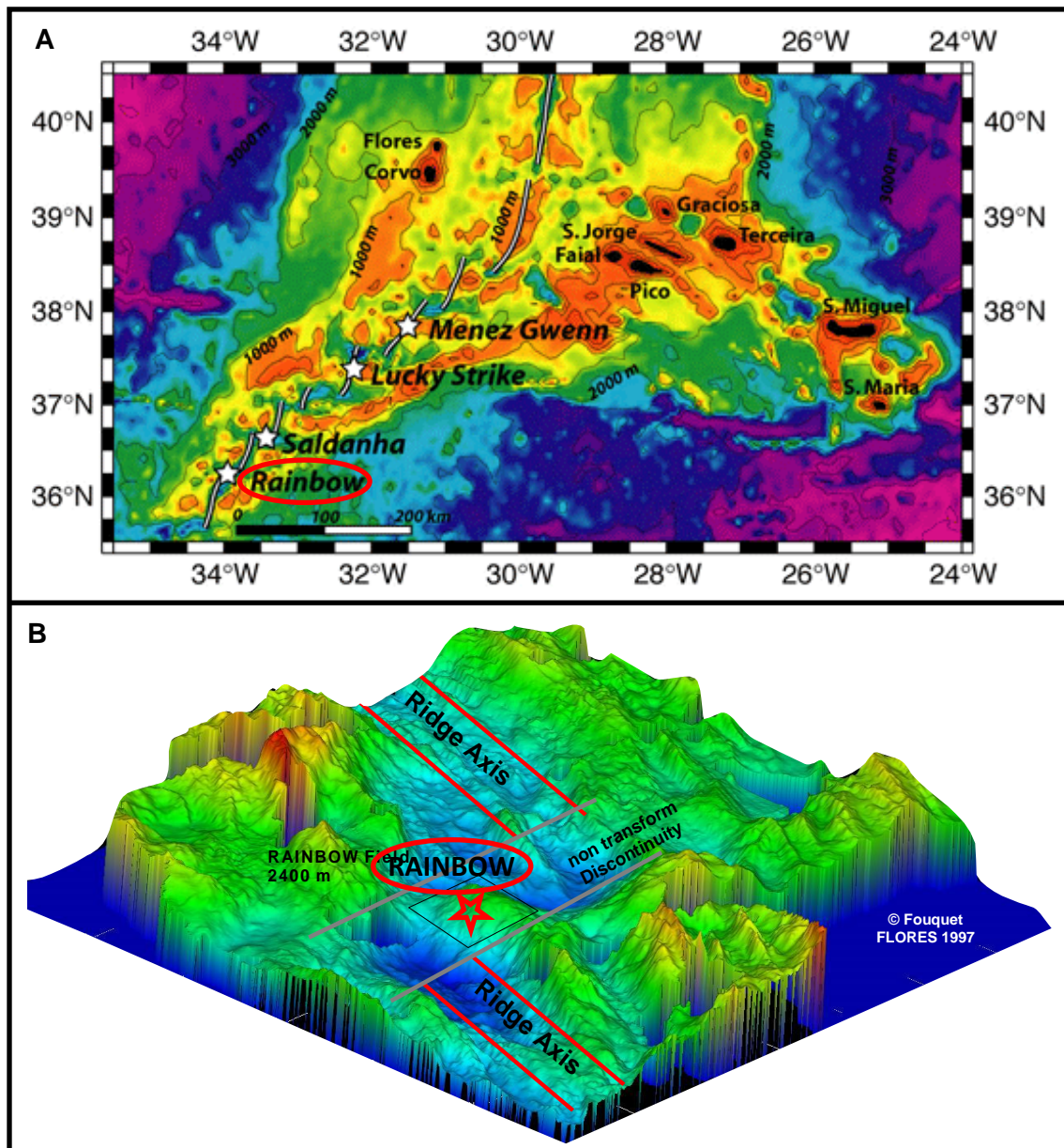


Fig.14 – Location and structure of the Rainbow ultramafic-hosted vent site. A, topology of the Azorean segment of the Mid-Atlantic Ridge showing the nine islands of the Azores Archipelago (from NE to SW: Flores, Corvo, Faial, Pico, São Jorge, Graciosa, Terceira, São Miguel, São Maria) and B, representation of the relief of the surroundings of the Rainbow site.

The Logatchev and Ashadzé sites are separated only by 200 km which could explain the clustering of the epibionts retrieved at these sites, revealed by the molecular analyses. The segregation between Rainbow and both Logatchev and Ashadzé specimens highlighted by the networks reconstructions revealed distinct relationships within the haplotypes populations regardless of the site origin of the host. The structure of the epibiont populations from Rainbow showed very distinct haplotypes and the absence of an ancestral individual. Commonly, it is the case for ancient populations in which the speciation phenomenon is in

progress. In contrast, the structure of the epibiont populations from both Logatchev and Ashadzé sites showed there was a main haplotype from which other haplotypes have evolved. This is a typical signature of a bottle-neck in the population produced by a recent event increasing the selective pressure or to a recent demographic expansion. The structure of the TAG epibiont populations seemed to be a mix of both previous structures, harbouring a main haplotype and several other distinct ones. Our results tend to propose an ancient evolutive story for the *R. exoculata* gut epibiosis at Rainbow and TAG sites and a very recent and common expansion at Ashadzé and Logatchev sites evolving from a limited number of individuals.

In order to complete this study, other sites should be explored to reconstruct the shrimp and its epibionts evolutionary and expansion history. It could be interesting to study the phylogeography of the epibionts populations using another genetic marker than the 16S rRNA gene which could be not enough informative. Pyrosequencing approaches will be performed to search possible free-living forms of the gut-resident epibionts and to complete the molecular survey of the epibiont populations. The first results on gut samples tend to confirm the presence of the four phyla (*Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilon-* and *Gammaproteobacteria*, pers. com.). Then, a metagenomic approach will be undertaken to study roles and functions of the epibiont communities.

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.I., 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.
- 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.
- Brazelton, W.J., Ludwig, K.A., Sogin, M.L., Andreishcheva, E.N., Kelley, D.S, Shen, C.-C., Edwards, L.R. and Baross, J.A. (in press) Archaea and Bacteria with surprising microdiversity show shifts in dominance over 1,000-year time scales in hydrothermal chimneys. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- 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.
- Clark, T. B. (1984) Diversity of *Spiroplasma* host-parasite. *Isr. J. Med. Sci.* **20**:995-997.
- 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 1* **49**:395-412.
- Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., Von Herzen, R.P., Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K. and Van Andel, T.H. (1979) Submarine thermal springs on the Galápagos Rift. *Science* **203**(4385): 1073-1083.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A (2009) Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com/>
- Durand, L., Zbinden, M., Cuff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E.G., Shillito, B. and Cambon-Bonavita M.-A. (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. and Desbruyères, D. (in prep.) Hydrothermal vent community of a new deep-sea field Ashadze-1, 12°58'N on the Mid-Atlantic Ridge and a comparison of all northern Atlantic chemosynthetic communities.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lin, X., Wakeham, S.G., Putnam, I.F., Astor, Y.M., Scranton, M.I., Chistoserdov, A.Y., and Taylor, G.T. (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.
- Lopez-Garcia, 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.
- Maniloff, J., and Morowitz, H. J. (1972) Cell biology of the *Mycoplasmas*. *Bact. Rev.* **36**:263-290.
- Petersen, J.M., Ramette, A., Lott, C., Cambon-Bonavita, M.-A., Zbinden, M. and 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.* **1**(5):319-335.
- 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. and Sargent, J.R. (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., Henriques, C., Jones, E.G. and King, N. (2006) The absence of sharks from abyssal regions of the world's oceans. *Proc. R. Soc. B* **273**:1435-1441.
- 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.
- Razin, S. (1978) The *Mycoplasmas*. *Microbiol. Rev.* **42**:414-470.
- Razin, S. (1998) Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1094-1156.
- Regassa, L. B., and Gasparich, G. E. (2006) *Spiroplasma* : evolutionnary relationships and biodiversity. *Front. Biosc.* **11**:2983-3002.
- Rossello-Mora, R. and R. Amann (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Reviews* **25**: 39-67
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- 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.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M. and Herndl, G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(32):12115-12120.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, et al. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(3): 1043-1047
- 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.
- Uhart, M., Sirand-Pugnet, P. and Labarère, J. (2007) Evolution of mitochondrial SSU-rDNA variable domain sequences and rRNA secondary structures, and phylogeny of the *Agroclybe aegerita* multispecies complex. *Res. Microbiol.* **158**:203-212.
- 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.

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. *Microbiol. Ecol.* **46**:23-30.

Zbinden, M., Shillito B., Le Bris N., De Villardi de Montlaur C., Roussel E., Guyot F., Gaill F. and Cambon-Bonavita M.-A. (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.

1.2 - Conclusions de cette étude

Rappel des principaux résultats – La comparaison des communautés bactériennes associées au tractus de spécimens de *R. exoculata* provenant de différents sites de la Ride médio Atlantique montre que l'épibionte filamenteux décrit dans la précédente étude est également retrouvé dans le mésentéron des spécimens des autres sites et représente toujours le morphotype dominant. Les analyses moléculaires montrent l'existence de plusieurs populations. La première est constituée des phylotypes de *Gammaproteobacteria* retrouvés exclusivement sur le site Rainbow et donc liés à ce site. Ces phylotypes pourraient être allochtones. La deuxième est constituée de phylotypes d'*Epsilonproteobacteria* proches d'épibiontes de la cavité céphalothoracique de *R. exoculata* et à des clones environnementaux ce qui indique que ces communautés seraient acquises dans l'environnement. La seconde correspond aux *Deferribacteres* et *Mollicutes*, non retrouvés dans l'environnement, donc spécifiques à *R. exoculata*. Les séquences relatives aux *Deferribacteres* et aux *Mollicutes* sont regroupées en phylotypes très éloignés des premières espèces décrites. De plus, ces phylotypes sont très conservés (>99 %), quel que soit le site d'origine. Cela semble indiquer une forte co-évolution entre l'hôte et ses épibiontes et de fait, une transmission verticale de ces phylotypes. La reconstruction de réseaux des relations évolutives pour les épibiontes résidents affiliés aux *Deferribacteres* et aux *Mollicutes* suggère une histoire évolutive différente de l'association hôte-épibiontes en fonction du site. Les spécimens du site Rainbow semblent présenter une particularité taxinomique suggérant une histoire évolutive ancienne. Tandis que les sites Logatchev et Ashadze sembleraient avoir été colonisés plus récemment par notre modèle.

Expériences complémentaires – Afin de réaliser une étude plus complète de 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 constatée. Les sites hydrothermaux de la MAR sur lesquels l'espèce *R. exoculata* est présente étant 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 appelle la mise en oeuvre de nouvelles campagnes d'exploration. Le genre *Rimicaris* est également présent dans d'autres régions présentant une activité hydrothermale comme le point triple dans 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 *Palaemon* sp., *Macrobrachium* sp., ou autre) permettrait d'aller plus loin dans la compréhension de la colonisation microbienne du mésentéron chez les crustacés.

L'étude de stades précoces du développement de *R. exoculata*, tels que des œufs, des larves et des juvéniles devrait permettre d'étayer l'hypothèse d'une transmission verticale des épibiontes. Une étude détaillée des communautés microbiennes du tractus digestif en fonction du sexe de l'individu adulte pourrait également permettre de définir si la transmission est maternelle et ainsi, savoir comment sont transmis les épibiontes.

Chapitre III

Activité des épibiontes associés au tractus digestif de *Rimicaris exoculata* en fonction du stade de mue et du niveau de nutrition

CHAPITRE III

ACTIVITE DES EPIBIONTES ASSOCIES AU TRACTUS DIGESTIF DE *RIMICARIS EXOCULATA* EN FONCTION DU STADE DE MUE ET DU NIVEAU DE NUTRITION

1 - “Influence of moult stage and nutrition level on the epibiont gut microbial communities of *Rimicaris exoculata*” Durand et al., *in prep.*

1.1- Introduction de l'étude



Etat de l'art – La communauté microbienne associée au tractus digestif de *R. exoculata* est constituée d'une population allochtone et d'une population autochtone résidente. A ce jour, la nature de cette association n'est pas connue mais les différents travaux sur ce modèle biologique semblent renforcer l'hypothèse d'une association mutualiste à transmission verticale. Le cycle de mue de *R. exoculata* est rapide ce qui nécessite d'importantes ressources énergétiques fournies par le métabolisme de l'hôte lui-même et/ou par l'activité des communautés épibiontes. L'exuviation présente certaines contraintes pour l'hôte qui peuvent avoir une incidence sur les populations épibiontes. Le mésentéron n'est pas recouvert d'une cuticule, les épibiontes résidents ne sont donc pas éliminés à chaque mue. Au cours de la période précédant et succédant l'exuviation, le crustacé cesse de s'alimenter. Les conditions chimiques au sein du tractus digestif sont donc modifiées (absence d'apport externe en nutriments, oxygénation du lumen...). Ce sont donc des événements que doivent pallier les épibiontes situés dans le mésentéron en subvenant à leurs besoins énergétiques et éventuellement à ceux de l'hôte. D'autant que les différentes observations (nos études et Segonzac, com. pers.) montrent peu ou pas de fragments de cuticule dans le bol alimentaire laissant supposer que *R. exoculata* ne consomme pas son exuvie contrairement à de nombreux crustacés (Compère, com. pers.). Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'exuvies accumulées au pied des cheminées hydrothermales.

Cette capacité d'adaptation est nécessaire pour la colonisation des écosystèmes hydrothermaux marins profonds car elle impose un mode de vie adapté à l'exposition à des conditions géochimiques très variables. Dans le modèle *R. exoculata*, l'hôte et les épibiontes sont confrontés à cet environnement changeant. Pour maintenir une certaine activité, la communauté épibionte doit être très réactive sur un plan métabolique. Cette étude a été réalisée afin d'analyser

l'influence de la mue et des conditions géochimiques sur l'activité et la composition de la communauté épibionte associée au tractus digestif de *R. exoculata*.

Méthodologie utilisée et résultats obtenus – Des expérimentations *in vivo* ont été réalisées en incubateur pressurisé. Des spécimens de *R. exoculata* ont été incubés dans différents milieux présentant des conditions chimiques différentes établies d'après les conditions *in situ*. En parallèle, des incubations en présence de BrdU (la Bromo-désoxy-Uridine est un analogue de base de l'ADN) ont été effectuées pour mettre en évidence la division cellulaire des épibiontes sous ces différentes conditions. Des individus à des stades de mue distincts ont également été étudiés. La composition (ADN) et l'activité (ARN) de la communauté épibionte du tractus digestif ont été analysées par des méthodes moléculaires (gène de l'ARNr 16S et ARNr 16S) et microscopiques (microscopie photonique et électronique à transmission, hybridations *in situ*). Les résultats confirment qu'il s'agirait d'une association mutualiste complexe impliquant principalement les trois groupes phylogénétiques (*Deferribacteres*, *Mollicutes* et *Epsilonproteobacteria*) et suggèrent une acquisition des épibiontes à un stade de développement précoce.



Running title: Influence of moult and nutrition on the *Rimicaris exoculata* gut epibionts

**Influence of moult stage and nutrition level on the epibiont gut
microbial communities of *Rimicaris exoculata*.**

Lucile Durand¹, Marie Roumagnac¹, Valérie Cueff-Gauchard¹, Marine Haond¹, Magali Zbinden², Cyrielle Jan¹, Julie Ponsard³, Philippe Compère³, Bruce Shillito² and Marie-Anne Cambon-Bonavita^{1*}

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

² UMR CNRS 7138, Systématique, Adaptations et Evolution, Université Pierre et Marie Curie, 7 Quai Saint Bernard, 75252 Paris cedex 05, France

³ Laboratoire de Morphologie Fonctionnelle et Evolutive (Unité de Morphologie Ultrastructurale), Université de Liège, Institut de Chimie, allée de la Chimie, 3, 4000 Liège 1, Belgium

Corresponding author – E-mail macambon@ifremer.fr

Tel. (+33)298224756

Fax. (+33)298224757

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

Abstract

An epibiosis has been described in the gut of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. Previous studies showed that these resident microbial communities were affiliated to the *Deferribacteres*, the *Mollicutes* and the *Epsilonproteobacteria*. The influence of the moult cycle on the epibiotic gut microbial communities has been analyzed on specimens at different moult stages. *In vivo* experiments in a pressurized incubator were done to study the influence of the nutrition level on the epibiotic gut microbial communities. Finally, BrdU incorporation experiments were also performed in order to highlight the cell division of the epibionts under distinct experimental conditions. Molecular and microscopic approaches showed that the presence of the filamentous epibionts and the distribution of the three phyla were not affected by the experimental conditions neither by the moult stage. The BrdU experiments indicated that during the time of the incubation, no DNA division neither cell division had occur among the epibiotic filamentous population. The RNA amplifications data revealed an influence of the moult stage and the environmental conditions on the activity of the epibionts communities. These results raise the question about when and how the gut epibiont are acquired.

Key words: *Deferribacteres* / *Epsilonproteobacteria* / *Mollicutes* / Moult cycle / Nutrition level / *Rimicaris exoculata*.

Introduction

The Arthropoda clade is the most abundant phylogenetic group of the Animal Kingdom (about 80 % of known species). One of the main phylogenetic characters of arthropods is the existence of an exoskeleton, commonly named cuticle. For most species, it is made up of tanned proteins and chitin, an extremely resistant polymer. Crustacean decapods have a particularity: the exoskeleton is constituted of calcified chitin. This rigid cuticle prevents arthropods growing continuously as vertebrates do. Then, the growth is discontinuous. Their life is governed by moult cycles, which consist of four stages. The moult, or exuviation, is the phenomenon during which arthropods change their cuticle against a larger one. The postecdysis is the period where the new cuticle is reinforced by calcium carbonates supplies. Then, the anecdysis stage is defined as a phase of pause of the integumental processes. It permits arthropods to restore their energetic resources. The preecdysis period is the final stage. It is the new cuticle synthesis period, under the older one. The next exuviation closes the moult cycle.

During the exuviations, the arthropods loose the external but also the internal cuticle which covers the internal organs such as the gut. The digestive tract is made up of three parts: the foregut or stomodaeum, the midgut or mesenteron and the hindgut or proctodaeum. The foregut comprises the mouth, the esophagus, the stomach and the pyloric chamber. It has crushing and filtration roles in the diet of the animal. It is covered by an integument which is lost during the exuviation. The midgut constitutes the central part of the digestive tract. The brush border of the epithelium is deprived of a cuticle. It represents an active exchanges zone for the absorption of nutrients together with the hepatopancreas. The hindgut (the rectum and the anus) is also covered by a cuticle. The animal ceases feeding since the last step of the preecdysis stage to the first steps of the postecdysis stage which may prevent tissues abrasion by the transient bolus (Lipcius and Herrnkind, 1982).

Numerous cases of bacterial colonization of the digestive tract have been described and bacteria can be pathogenic, commensal or symbiotic (for review see Harris, 1993). A symbiosis can be facultative or obligate. In the last case, host (and even symbionts) cannot live separately and usually no free-living bacteria are retrieved in the environment. Symbiotic relationships are based on exchanges between the host and the symbionts. They could provide a nutritive supply for partners, and/or a detoxification of toxic compounds usually by symbionts, and/or a natural barrier against pathogenic micro-organisms due to a competition between the specific gut microflora and the pathogens. The wood-boring marine isopod *Limnoria tripunctata* is a model for detoxification symbioses (Zacchary and Colwell, 1979; Zacchary et al., 1983). A specific microflora is established in the gut of hosts which rear on treated wood. This microflora is supposed to degrade the creosote, the toxic compound. The

symbiosis is facultative *i.e.* both symbionts and host can live separately, except for isopods inhabiting creosote-preserved wooden piling where the symbiosis becomes necessary. The termites gut microbial community is one of the most described trophic symbiosis. The host does not digest wood cellulose but *Cellulomicrobium* sp., a specific gut bacterium, degrades cellulose and provides nutrients to the host. Microbial colonization is mainly observed in the hindgut or in the digestive midgut glands (see Harris, 1993 for review) and sometimes in the midgut (Pinn et al., 1999; Demeri et al., 2009; Durand et al., 2010). Usually, it is an epibiosis *i.e.* microbial cells are in contact with the surface of host cells.

Rimicaris exoculata (Williams and Rona, 1986), a hydrothermal vent shrimp from the Mid-Atlantic Ridge (MAR), harbours specific gut microbial communities related to the *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Epsilonproteobacteria* phyla (Durand et al., 2010). These microbial communities were shown to be highly conserved regardless of the site origin which can be geochemically and physically contrasted (Durand et al., *in prep*). Until now, we do not know how and when the resident microbial communities are acquired. Part of the epibionts are inserted between the microvilli of the brush border cells and so, are not submitted to the exuviations, but are submitted to the moult starvation period. According to the molecular and *in situ* hybridization analyses, they could be identified as *Mollicutes* or *Epsilonproteobacteria* (Durand et al., 2010). Epibionts affiliated to the other phylogenetic groups (*Deferribacteres* and *Gammaproteobacteria*) have been identified by microscopic approaches as single rod cells or cocci in the gut content. Our results indicated that the resident gut microflora was not site-dependant (Durand et al., 2010, *in prep*) which may indicate that they are not acquired from the environment. Distinct resident microbial communities can be identified. The *Mollicutes*- and *Epsilonproteobacteria*-related sequences were retrieved both on reference and starved specimens. The *Deferribacteres* (75 % of clone sequences from reference samples) were poorly retrieved on starved specimens (Durand et al., 2010). A recent work estimated that the moult cycle duration of *R. exoculata* was 10 days (Corbari et al., 2008). The preecdysis and postecdysis periods are relatively fixed for crustaceans. So, we can think that the anecdysis period of *R. exoculata* is shorter than other crustaceans (Corbari et al., 2008). Taking into account the short duration of the moult cycle (so, its high moulting frequency) together with its energetic cost, this implies that this shrimp must have high nutritive supplies. Today, the *R. exoculata* diet is still not resolved. *R. exoculata* could be a deposit-feeder but microscopic observations of the bolus showed few bacteria and exceptionally exuviaes. In contrast it is full of sulphides and iron-oxides particles. We hypothesized that there was nutritive exchanges with the resident gut-epibionts which could provide nutrients to the host (Durand et al., 2010).

As arthropods cease feeding during the exuviations period, incubation experiments have been performed to be compared to the moulting physiological conditions occurring on

contrasted geochemical vent sites. Then, we have analyzed the resident microbial communities diversity according to the moult stage of the host and the effect of geochemical conditions of the site of origin through molecular and microscopic approaches.

Materials and methods

Sample collection

Samples were collected at the Rainbow hydrothermal vent site (36°14'N-33°54'W, 2320 m depth) on the MAR during successive cruises: ATOS 2001, EXOMAR 2005, MoMARDREAM-naut 2007 and MoMAR08 2008. Shrimps were collected using the slurp-gun of the ROV *Victor 6000* or the DSV *Nautile*, operated from the RVs *L'Atalante* or *Pourquoi pas?*. Prior to each dive, the bowls of the slurp-gun used for collecting the shrimps were aseptically washed with ethanol (96 %) before being filled with sterile seawater.

Once on board, live adult shrimps were immediately dissected under sterile conditions or used for *in vivo* experiments. They were treated for molecular analyses, microscopic observations and *in situ* hybridization analyses on board. The size of the shrimps was around 6 cm long. The shrimps were selected at two developmental stages: in the late anecdysis stage for the reference specimens and in the early postecdysis stage for the early moulted specimens. The individuals used for the *in vivo* experiments were in the late anecdysis stage. The sex of the specimens was not determined.

In vivo experiments

The pressurized vessel - Live shrimps were incubated in a pressurized incubator (IPOCAMP™). The stainless steel vessel (approximately 19 L) is a flow-through pressure system (Shillito et al, 2001). Pressure oscillations arising from pump strokes (100 rpm) were less than 1 bar at working pressure. The temperature of the flowing filtered (0.4 µm) seawater was constantly measured and regulated, in the inlet and outlet lines ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Less than 2 hours after sampling, live and active animals were re-pressurized at the *in situ* pressure: 23 MPa at the Rainbow site. The average incubation temperature was 15°C (Segonzac et al, 1993, Desbruyères et al 2001, Zbinden et al, 2004, Schmidt et al, 2008). Previous *in vivo* experiments showed that the shrimps were under good physiological conditions when re-pressurized following this procedure (Ravaux et al, 2003, Zbinden et al, 2008).

Starvation experiments - Live *R. exoculata* specimens were starved in sterile seawater during 72 hours during both EXOMAR and MoMARDREAM-Naut cruises to eliminate the bolus and associated micro-organisms (Zbinden et al, 2008; Durand et al., 2010). Live shrimps were dissected immediately after removal from the vessel and digestive tracts were stored for DNA-RNA analyses, fluorescent *in situ* hybridization analyses (FISH) and electron microscopic observations (SEM, TEM) as detailed in Durand et al., 2010. In this

study, the specimens submitted to the 72-hour starvation experiment were named starved specimens.

Chemical pulses - Live *R. exoculata* specimens were submitted to 8-hours iron (sterile seawater enriched in FeCl_2 , 150 μM final concentration), sulphide (sterile seawater enriched in Na_2S 25 μM final concentration) or seawater (sterile seawater) pulses during the EXOMAR cruise to test the influence of different electron donors on the host and its epibionts. The seawater pulse was done as the blank experiment. These concentrations were adapted to those estimated from shrimps surrounding environment at the Rainbow site (Zbinden et al., 2004). Live shrimps were dissected immediately after removal from the vessel and digestive tracts were stored for DNA-RNA analyses, fluorescent *in situ* hybridization analyses (FISH), electron microscopic observations (SEM, TEM). In this study, the specimens submitted to the 8-hour chemical pulse experiments were named pulsed specimens.

BrdU incorporation - Three live *R. exoculata* specimens in each experimental condition were incubated for 1 hour during the MoMARDREAM-Naut cruise either in sterile seawater or in seawater enriched in different reducing compounds (Fe^{2+} , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/\text{S}^\circ$, CH_4 , H_2), 1 g/L NaHCO_3 as inorganic carbon source, and 1.6 mM 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU). The BrdU is a DNA base analogue used in this study in order to reveal bacterial division. The seawater experiment was done as the blank experiment. A total of 30 shrimps were incubated.

Incorporation and immunocytochemical detection of BrdU

The digestive tract of the incubated specimens was dissected on board, and fixed for 2 hours in 4 % paraformaldehyde-0.2 % glutaraldehyde-7/10 seawater buffer for immunolabeling of BrdU in electron microscopy. Then, the samples were rinsed twice and stored in filtered NaN_3 -seawater buffer (NaN_3 , SIGMA, St Louis, MO, USA, final concentration 6.7 mM) at 4°C before used. At the laboratory, samples were dehydrated through a graded ethanol series and then in 1,2-propylene oxide before being embedded in epoxy resin (SPI-PON™ 812, SPI supplies, West Chester, PA, USA). Resin polymerization was achieved after 3 days at 60°C. Ultra-thin sections (80 nm) were realized using a Reichert Ultracut-E ultramicrotome with a diamond knife and mounted on gold grids 400 mesh.

The labelling method was achieved in three steps, using a mouse anti-BrdU monoclonal antibody (ref. 11170376001, ROCHE, Penzberg, Germany), a biotin-labelled goat anti-mouse IgG (ref. B7401, SIGMA) as secondary antibody and a 10 nm gold-labelled streptavidin (ref. S9059, SIGMA). As pre-treatment, the sections were hydrolyzed for 30 min in 3.5 N HCl, rinsed in distilled water, incubated for 45 min in a PBS buffer (pH 7.2) containing 1:30 NGS-1 % BSA buffer, and then rinsed in PBS-BSA (1 %) buffer. Labelling

was achieved on sections incubated for 4 h at room temperature with the anti-BrdU antibody (1:50 dilution in PBS buffer pH 7.2) containing 1:50 NGS-0.2 % BSA solution. Sections were rinsed in PBS-0.2 % BSA buffers (pH 7.2 and then 8.2), and then incubated at room temperature for 1 h with a biotin-labelled goat anti-mouse IgG (1:50 dilution in PBS pH 8.2-NGS (1:30)- 0.2 % BSA) buffer and were finally rinsed in PBS (pH 8.2)-BSA (1 %) buffer. After pre-incubation in PBS pH 7.4-1 % BSA-0.1 % Tween 20, the samples were incubated at room temperature for 2 h with streptavidin (1:100 dilution) in PBS pH 7.4-0.05 % BSA-0.1 % Tween 20, then washed in the same buffer and finally in distilled water.

Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate before examination using a JEOL 100 SX (JEOL, Tokyo, Japan) electron microscope at 80 kV.

The BrdU incorporation and immunocytochemical detection procedures were tested on bacterial pure cultures (*E. coli*).

DNA extraction and PCR

DNA was extracted on board or at the laboratory from digestive tracts with the FastDNA[®] SPIN kit for soil (QBIogen, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's instructions and kept at 4°C. Six gut clone libraries were done on 2 pooled reference, 1 early moulted, 1 starved (EXOMAR 2005), 1 iron-pulsed, 1 sulphide-pulsed and 1 seawater-pulsed guts. Amplification of the bacterial 16S rRNA gene was performed using universal primers E8F/U1492R (respectively 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' and 5'-GTTACCTTGTACGACTT-3', 1484 bp) or E338F/U1407R (respectively 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3' and 5'-GACGGGCGGTGWGTRCAA-3', 1069 bp) as detailed in Durand et al., 2010.

RNA extraction and PCR

RNA was extracted on board or at the laboratory on digestive tracts with the FastRNA[®] SPIN kit for soil (QBIogen, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's instructions and kept at -20°C. Seven gut clone libraries were done on 1 reference, 2 pooled early moulted, 1 starved (EXOMAR 2005), 1 starved (MoMARDREAM-Naut 2007), 1 iron-pulsed, 1 sulphide-pulsed and 1 seawater-pulsed guts. Retro-transcription of the RNA then amplification of the bacterial 16S rRNA gene were done using the One step[®] kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the universal primers E8F/U1492R or E338F/U1407R on approximately 20 ng RNA template in a final volume of 50 µL. RT-PCR were performed using the following conditions: the RNA was retro-transcribed during 1 cycle of 30 min at 50°C, then the polymerase was activated during 15 min at 95°C and finally the cDNA was amplified as detailed in Durand et al., 2010 (with 40 cycles).

Cloning and amplified ribosomal DNA restriction analysis

PCR products were cloned using the pGEM-T (Promega, Madison, USA) or TOPO[®] XL Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Positive clones were amplified by PCR with primers M13F/M13R (5'-GTAAAACGACGGCCA-3'/5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Amplifications were performed in a final volume of 25 μ L, containing 1 bacterial colony, 0.6 U GoTaq polymerase (Promega), 5 μ L 5X buffer, 0.4 μ M of each primer, 0.8 mM dNTP mix and 4 mM MgCl₂. Bacterial cells were first lysed during 20 min at 94°C, then DNA was amplified during 30 cycles (denaturation, 1 min at 94°C; annealing, 1.5 min at 55°C; elongation, 2 min at 72°C) followed by 6 min for the final elongation at 72°C. The quality of the PCR products was controlled after a 1% agarose gel migration. Then, DNA was hydrolysed over night at 37°C in a final volume of 20 μ L. The reaction mix contained 10 μ L PCR product, 4 U *Hha* I enzyme (Promega), 2 μ L 10X specific buffer and 0.2 μ L 100X BSA. DNA fragments were separated on a 2% agarose gel migrating for 3.5 hours at 70V. Clones were clustered according to the profile patterns which were manually determined. Between 1 and 10 clones per profile were selected for sequencing.

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

Phylogenetic analyses (in progress)

Phylogenetic analyses were done on 6 *R. exoculata* gut clone DNA libraries (2 reference pooled guts, 1 early moulted, 1 starved, 1 iron-pulsed, 1 sulphide-pulsed and 1 seawater-pulsed guts) and 7 RNA libraries (1 reference gut, 2 early moulted pooled guts, 1 long-starved gut from EXOMAR and MoMARDREAM-Naut cruises, 1 iron-pulsed, 1 sulphide-pulsed and 1 seawater-pulsed guts).

Sequences were identified through BLAST using the NCBI BLAST program (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) within GenBank (Altschul et al, 1990). They were processed and edited in Geneious Pro version 4.6 (Drummond et al., 2009) and aligned using CLUSTALW (Thompson et al, 1994) algorithm. Sequences displaying more than 98 % similarity level were considered to belong to a single phylotype (OTU) and were clustered together. Only homologous positions were included in the final alignment. Before running phylogenetic reconstruction, the best model describing the molecular evolution of sequences was inferred for each cluster of OTUs, using ModelTest version 3.7 (Posada and Crandall, 1998) with the Akaike Information Criterion (AIC). The

phylogenetic reconstructions were then performed using the parameters describing the most likely model of evolution determined by Modeltest. Neighbor-joining phylogenetic analyses (Saitou and Nei, 1987) were conducted using PHYLO-WIN (Galtier et al, 1996) and maximum likelihood (Felsenstein, 1981) using PhyML (Guindon and Gascuel, 2003) through the University of Oslo Bioportal (www.bioportal.uio.no/). Bootstrap support analyses (Felsenstein, 1985) were performed running 100 bootstrap replicates for each data set.

In order to obtain a visual representation not constrained by the dichotomic construct of regular phylogenetic trees, other relationships between clusters of haplotypes describing bacterial lineages of the *Deferribacteres* and of the *Mollicutes* datasets were also reconstructed and represented by a network using the software NETWORK version 4.5.1.6 (Fluxus Technology Ltd. at www.fluxus-engineering.com) with the median-joining method (Bandelt et al., 1999).

Sequences were named following the key code: site of origin of the host (R = Rainbow), number of the clone sequence and the sample position (R = reference, M = early moulted, LS = starved, Fe = iron-pulsed, Sul = sulphide-pulsed and SW = seawater-pulsed specimens). The RNA clone sequences named were preceded by *td* (for digestive tract). The RNA clone sequences of early moulted individuals were preceded of the initials of the cruise (EXO = EXOMAR and MOM = MoMARDREAM-Naut).

Light and electron microscopic observations

Samples for light and TEM (Transmission Electron Microscopy) observations were prepared as described in Durand et al., 2010. Observations were carried out on a Zeiss 201 electron microscope, operating at 80 kV. Three specimens were observed in light microscopic observations: 1 reference, 1 sulphide-pulsed and 1 seawater shrimps. Two specimens were observed in TEM: 1 reference and 1 early moulted shrimps.

Fluorescence in situ hybridization

In situ hybridization analyses were performed on 1 reference gut, 1 early moulted guts, 1 starved gut from EXOMAR and 2 from MoMARDREAM-Naut cruises, 1 iron-pulsed, 1 sulphide-pulsed and 1 seawater-pulsed guts) in order to confirm the presence of the gut-resident epibiotic community. Samples were prepared as described in Durand et al., 2010. The sections were hybridised during 3 hours at 46°C with a 30 % formamide buffer. All specimens were hybridized with the universal probe (Eurogentec, Liège, Belgium) Eub338 targeting the most of the *Eubacteria*, (Amann et al., 1990). Observations were performed on 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 on 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 software (Qimaging) or the AxioVision digital image processing software (Zeiss).

Results and Discussion

Macroscopic observations

Once on board, the reference *R. exoculata* specimens were actively moving and looked like in good health. After the incubations in the vessel, the shrimps were still actively moving regardless of the experimental conditions. The gut of some of the starved shrimps was not empty after the 72-hour starvation experiment. So, these samples were not used for the molecular analyses. The gut of each early moulted specimen was always free of any content. This result indicated that a complete gut content expulsion occurred during the moult. Regarding the 10 days length of the moult cycle, a 72-hours starvation experiment is probably long enough to be compared to the natural moult starvation duration. So, we can suppose that the gut content expulsion procedure due to the natural moult starvation is much more effective than our 72 hours starvation experiment.

Microscopic observations

The filamentous epibionts were retrieved in dense population in all the *R. exoculata* specimens, whatever the experimental condition. They were inserted between the microvilli of the gut epithelial cells and harboured the same morphology than previously described (Fig.1, Durand et al., 2010). The detail of the bacterial cells (Fig.1D) revealed the existence of a cell wall which excluded the hypothesis that they could be the *Mollicutes*-affiliated epibionts. No bacterial division was observed in transmission electron microscopy. Epibionts were long and thin single-celled reaching less than 0.3 μm diameter and up to 20 μm long. The filamentous epibionts were the unique bacterial community observed in the empty gut of starved and moulted specimens. No other microbial morphology such as rods or cocci was observed.

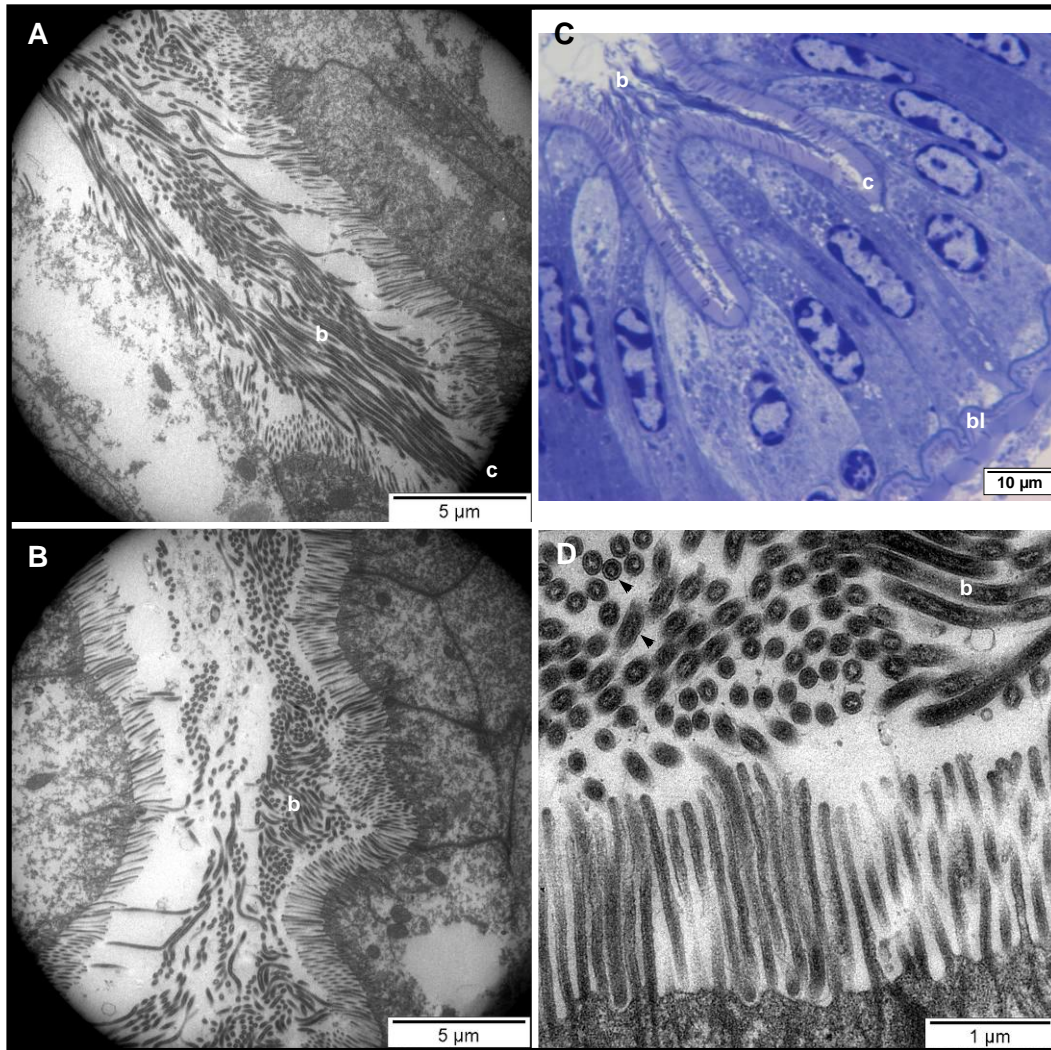


Fig.1 – *R. exoculata* gut epibionts observed in transmission electron microscopy (A,B,D) on an early moulted specimen and in light microscopy (C) on a reference specimen. Filamentous epibionts were inserted between the microvilli of the brush border of the gut epithelial cells, often harbouring deep crypts (A, C). The narrow heads indicates the gut epibionts on which the thick cell wall is highly visible (D). b = bacteria, bl = basal lamina, c = crypts of the gut epithelium.

The junction between the pyloric stomach and the midgut was very thin and so, was often broken during the dissection of the animal. For the needs of the resin-embedding procedures, the guts were divided in four successive parts (in this study, we named them as central and terminal parts, the last ones being the extremities of the gut sample). Therefore, it was not possible to determine the antero-posterior orientation of the gut after they were fixed. Sections within each of the four parts were observed to recover the total gut length (Fig.2-3-4).

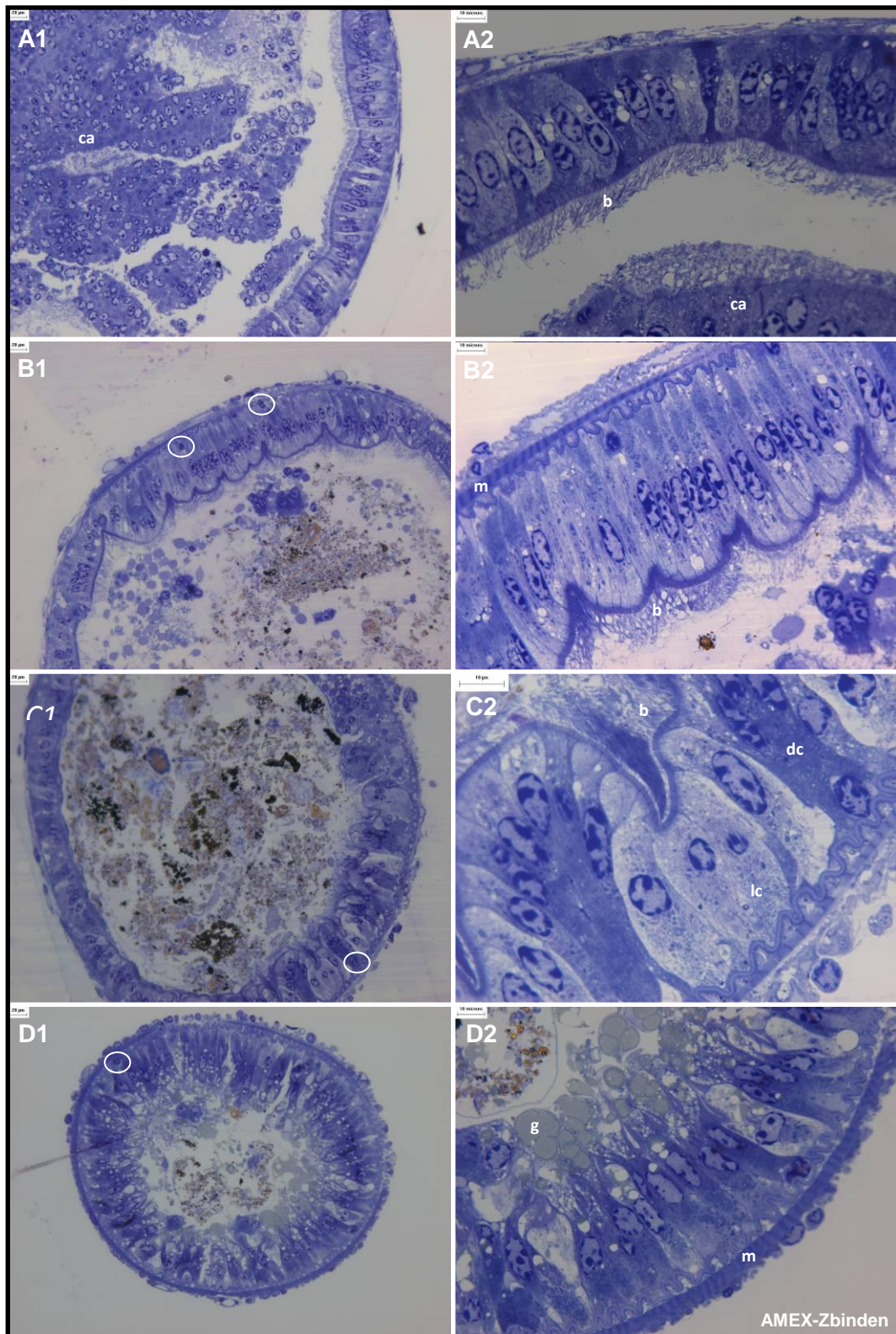


Fig.2 – Midgut observation of a reference *R. exoculata* specimen in light microscopy showing the epibionts all along the midgut, a dense cell aggregate (A), the distinct epithelial structure according to the midgut part (A to D) and the active excretory region (D). The inferred orientation of the sample was A as the more anterior region to D as the more posterior region. b = bacteria, ca = cell aggregate, dc = darker cell, g = granule, lc = lighter cell, m = muscle. Basal-oriented single cells are circled.

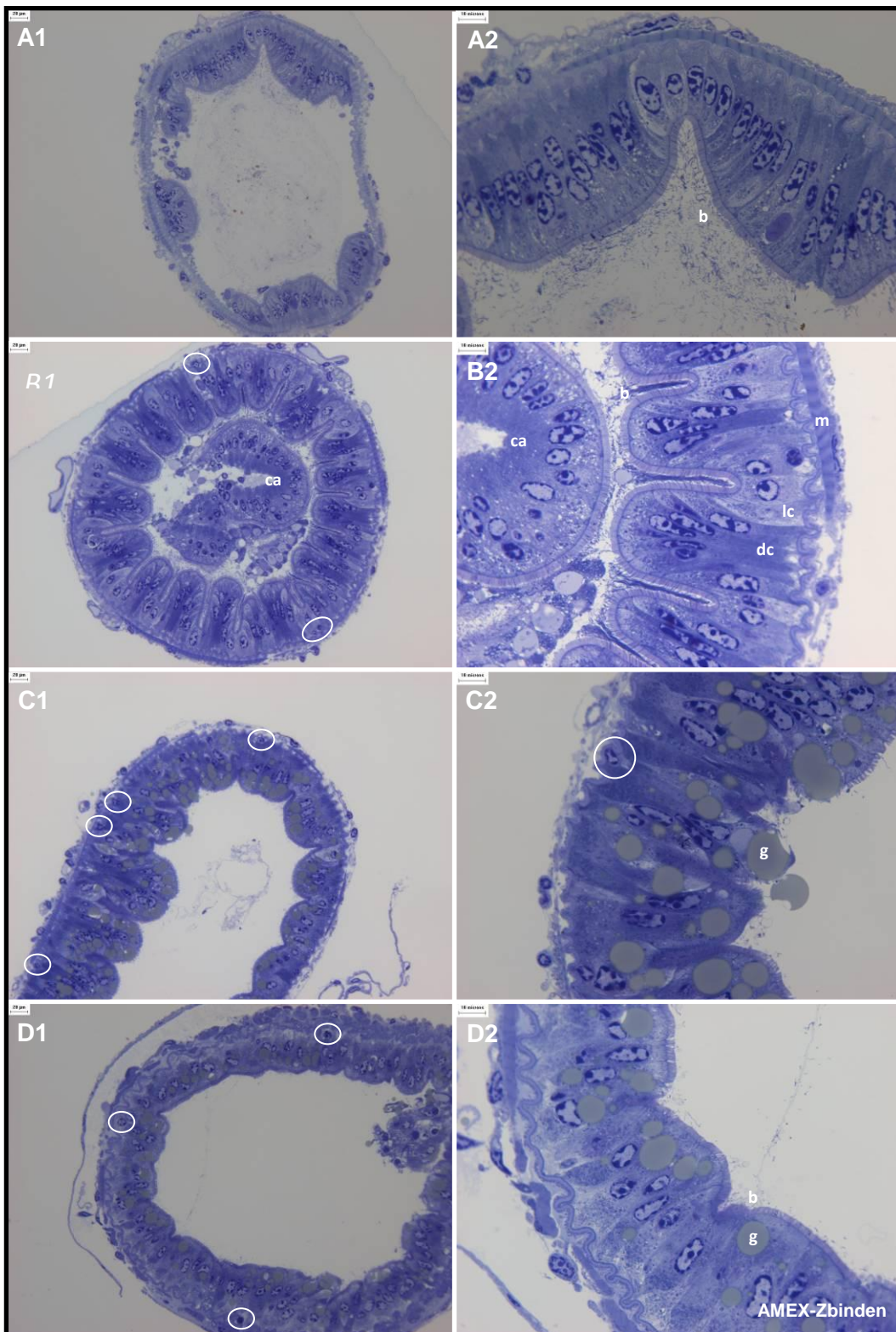


Fig.3 – Midgut observation of a sulphide-pulsed *R. exoculata* specimen in light microscopy showing the epibionts all along the midgut, the epithelium renewing (A), a dense cell aggregate (B), the distinct epithelial structure according to the midgut part (A to D) and the active excretory region (C-D). The inferred orientation of the sample was A as the more anterior region to D as the more posterior region. b = bacteria, ca = cell aggregate, dc = darker cell, g = granule, lc = lighter cell, m = muscle. Basal-oriented single cells are circled.

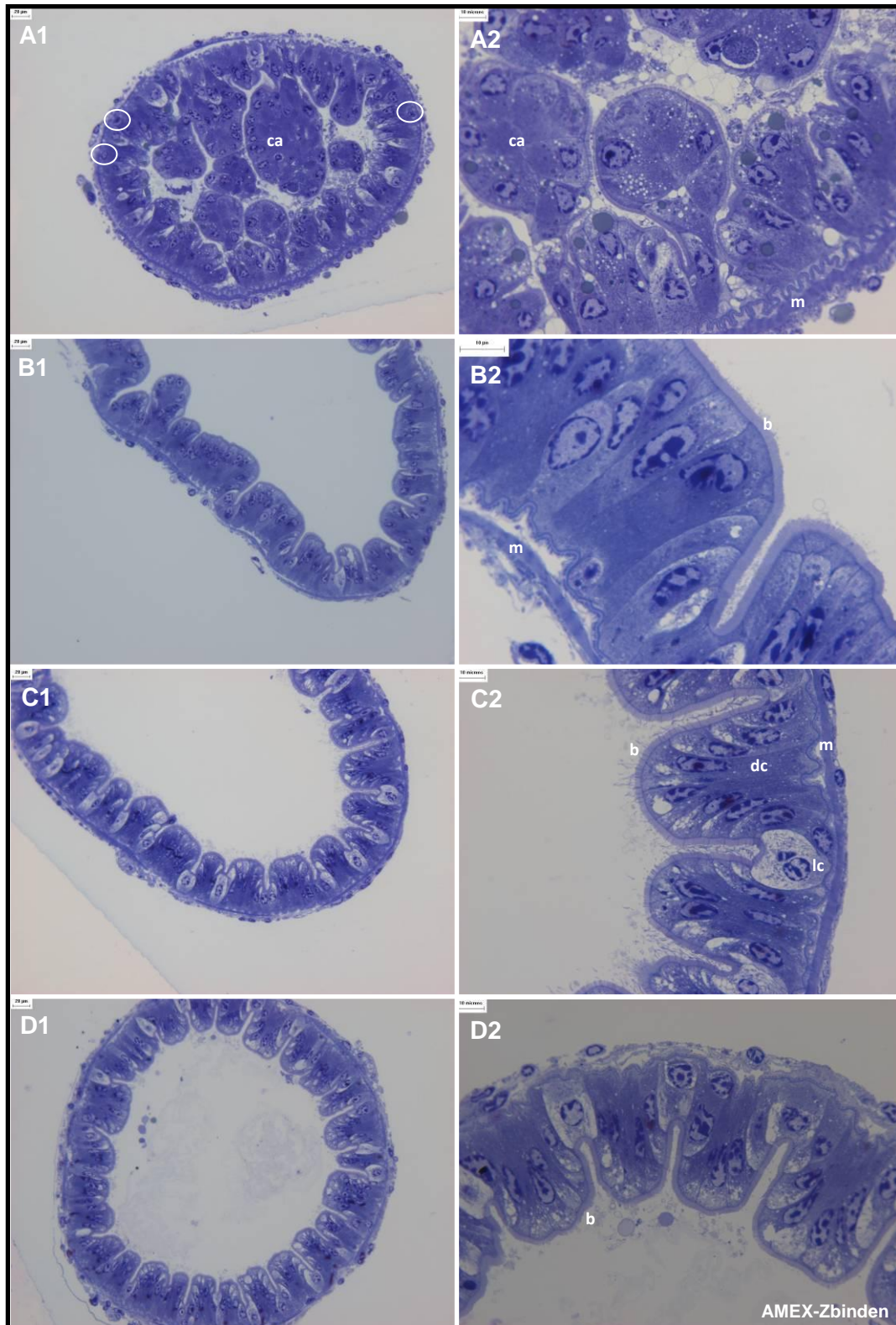


Fig.4 – Midgut observation of a seawater-pulsed *R. exoculata* specimen in light microscopy showing the epibionts all along the midgut, a dense cell aggregate and the renewing of the epithelium (A) and the distinct epithelial structure according to the midgut part (A-D). The inferred orientation of the sample was A as the more anterior region to D as the more posterior region. b = bacteria, ca = cell aggregate, dc = darker cell, g = granule, lc = lighter cell, m = muscle. Basal-oriented single cells are circled.

We did not observe any section showing a cuticle, which suggested that the hindgut might be very short, and might be restricted to the anal region (rectum). The whole length of the observed guts was deprived of a cuticle but a basal lamina was always present and so, the sections corresponded to the midgut. Observations showed that the cell structure of the gut epithelium was distinct according to the gut part (Fig.2-3-4). The midgut epithelium was composed of several cell types in which some of them looked like R and B cells, usually encountered in the hepatopancreas tubules. Three main observations could be pointed out. (1) Dense cell aggregates were retrieved in the light of one of the midgut terminal parts (Fig. 2 A1-A2, 3 B1-B2, 4 A1-A2). It seemed to be a part of the gut epithelium cells which could be renewed (Fig. 3 A1-A2). So, we could infer the antero-posterior position of the sections according to the stage of degradation of the cell aggregates. We considered these sections as the anterior part of the midgut. (2) An active excretory region could be observed on one of the midgut terminal parts (Fig. 2 D1-D2, 3 C1-C2-D1-D2). Large lipids granules could be storage reserves used by the animal (and/or the epibionts) during the moult period (from the preecdysis to the postecdysis stage). Or they also could be lubricating component used to facilitate the gut content transit. We considered these sections as the posterior part of the midgut. (3) Considering the inferred antero-posterior orientation, we could observe an evolution of the epithelium structure from a unique-cell-type epithelium composed of long thin darker cells (Fig.2 B1-B2) to a two-cell-type epithelium. In the central parts of the midgut, the epithelium was mainly composed of the long thin darker cells but there were big lighter cells in the epithelium crypts (Fig. 2 C1-C2, 3 B1-B2, 4 B1-B2-C1-C2-D1-D2), which were not observed in the more terminal parts. Thus, the cell organization of the midgut epithelium of *R. exoculata* was relatively uncommon among crustacean in which the midgut is usually composed of a unique cell type (Icely and Nott, , 1992) of which the main functions are the secretion of the peritrophic membrane and the water absorption during the moult period. The digestion and the nutrients absorption are usually achieved by the hepatopancreas epithelial cells (Vogt, 1994, 1996). Our observations suggested a more important role of the midgut in the absorption of nutrients than usually observed in crustaceans. Another particularity of the digestive tract of *R. exoculata* was the structure of the muscular network circling the midgut. The muscular belt was constituted of striated muscles (Fig.2 B2-C2-D2, 3 A2-B2, 4 A2-B2-C2) instead of smooth muscles. This suggested an active control of the intestinal transit which is very uncommon in the animal kingdom and might play a role in the mineral bolus discharge. In the midgut epithelium, some single cells were observed, harbouring a basal orientation without contact with the light of the midgut (Fig.2 B1-C1-D1, 3 B1-C1-D1, 4 A1). They could be M cells, usually encountered in the hepatopancreas epithelium where they are thought to have an endocrine activity to regulate the epithelial cells or the muscular network activities (Vogt, 1994). As observations of a basal lamina indicated clearly that these sections

were the midgut, the observed M cells could be linked to the existence of a striated muscular belt.

The tissue organisation of the midgut on the three specimens studied in light microscopy was similar whatever the experimental condition (reference, sulphide-pulse and seawater pulse). Observations revealed also that the filamentous epibionts were retrieved regardless of the experimental condition. But their distribution was not continuous all along the digestive tract. In fact, the epibiont populations were more or less dense regarding the section observed (Fig. 2 A2-B2-C2, 3 A2-B2-C2-D2, 4 B2-C2-D2). This let us supposed a host control on the epibiont settlement. The uncommon structure of the midgut epithelium of *R. exoculata* could also be due to numerous active exchanges with the epibionts. These possible exchanges could be reciprocal between the host and the bacteria but they could be one-way relationships from the epibionts to the host or conversely.

BrdU incorporation

The pure bacterial cultures were positively labelled using the BrdU incorporation and immunocytochemical detection procedures. The chemical compounds used to enrich the shrimps incubation seawater were selected according to the microbial metabolisms which could (co-)occur within the epibiont communities (*ie* sulphide-oxidation, iron-oxidation and iron-reduction, Zbinden et al., 2004, 2008). The microscopic observations of the guts of *R. exoculata* incubated in BrdU-enriched media did not revealed any bacterial incorporation regardless of the chemical compound used. This result suggested the absence of DNA replication and cell division of the filamentous epibionts which could also be due to a host control of the microbial infestation.

Molecular analyses

A total of 468 16S rRNA gene clone sequences (Tab.1A) and 820 16S rRNA clones sequences (Tab.1B) were treated to study the incidence of the moult stage and the nutrition level on the gut epibionts of *R. exoculata* distribution and activity. The aim of the chemical pulse experiments was to favour specific micro-organisms thought to occur among the epibiont communities such as iron-reducing (and may be iron-oxidizing) and sulphide-oxidizing bacteria. The usual main phyla were retrieved (the *Deferribacteres*, the *Mollicutes* and the *Epsilonproteobacteria*, Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Durand et al., 2010) and clone sequences clustered with the *R. exoculata* gut clone sequences previously obtained (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Durand et al., 2010) with a high similarity level (the phylogenetic reconstructions are in progress).

The DNA analyses showed that the distribution of the bacterial phyla was different according to the experimental condition (Tab.1A). The reference and the starved specimens harboured mainly the three bacterial gut communities (the *Deferribacteres*, the *Mollicutes*, the *Epsilonproteobacteria*, Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Durand et al., 2010). But the bacterial community of the reference shrimp was dominated by the *Deferribacteres* whereas it was dominated by the *Gammaproteobacteria* in the starved shrimp (Durand et al., 2010). In the early moulted specimen, the DNA analysis highlighted a significant difference in the composition of the bacterial community with strong dominance of the *Epsilonproteobacteria*-related sequences in our clone library. This might be correlated to the total absence of gut content in the early moulted specimens. The dominant epibiont morphotype observed in all the gut studied, regardless of the site origin (Durand et al., *in prep*) and the experimental condition were the filamentous epibionts. So, these results could strengthen the hypothesis that the filamentous epibionts could be *Epsilonproteobacteria*, as shown by FISH analyses (Durand et al., *in prep*). However, the DNA analyses showed that the *Deferribacteres*-related sequences dominated the clone libraries of the three chemical pulse experiments where the gut content was still present.

Tab.1 – DNA and RNA analyses: distribution of the 16S rRNA gene (A) and 16S rRNA (B) clone sequences of the gut epibiont community associated with *R. exoculata* specimens from the Rainbow hydrothermal site.

A DNA analyses: Number of 16S rRNA gene clone sequences							
Specimen (cruise)	Reference (EXOMAR)	Early moulted (MoMAR08)	72 hours-starvation (EXOMAR)	Iron pulse (EXOMAR)	Sulphid pulse (EXOMAR)	Seawater pulse (EXOMAR)	
Phyla							
<i>Deferribacterales</i>	51	2	2	29	22	43	
<i>Mollicutes</i>	10	5	19	5	0	1	
<i>ε-proteobacteria</i>	7	177	19	4	3	3	
<i>γ-proteobacteria</i>	4	0	33	4	2	0	
<i>β-proteobacteria</i>	0	0	1	0	0	0	
<i>δ-proteobacteria</i>	0	0	0	0	0	1	
<i>CFB</i>	2	7	0	1	0	2	
<i>Firmicutes</i>	1	0	8	0	0	0	
<i>Verrucomicrobiales</i>	0	0	0	0	0	0	
No of relative clones	75	191	82	43	27	50	

B RNA analyses: Number of 16S rRNA clone sequences							
Specimen (cruise)	Reference (EXOMAR)	Early moulted (MoMAR08)	72-hour starvation (EXOMAR)	(MoMARDREAM- Naut)	Iron pulse (EXOMAR)	Sulphid pulse (EXOMAR)	Seawater pulse (EXOMAR)
Phyla							
<i>Deferribacteres</i>	89	0	165	46	161	38	185
<i>Mollicutes</i>	26	16	1	0	0	0	0
<i>ε-proteobacteria</i>	46	3	0	0	0	0	0
<i>γ-proteobacteria</i>	3	16	0	0	3	3	0
<i>β-proteobacteria</i>	0	13	0	0	0	0	0
<i>δ-proteobacteria</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>CFB</i>	5	2	0	0	0	0	0
No of relative clones	170	51	166	46	161	41	185

The RNA analyses confirmed the results of the DNA analyses of the pulsed specimens (Tab.1B). The active microbial community was represented by the single *Deferribacteres* phylotype previously identified (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Durand et al., 2010, *in prep*). It was also the main phylotype in the starved and in the reference specimens clone libraries (but in less important proportion in the reference shrimp). Then we suggested some hypotheses to explain their dominance in these individuals. (1) The pulse and starvation experiments were inappropriate (because of the chemical compounds used, their concentration or the duration of the incubation) to affect significantly the bacterial gut communities. (2) *Deferribacteres*-affiliated epibionts were able to metabolise the whole compounds used in the pulse experiments and were much more active than the other communities. But we also observed a dominance of the *Deferribacteres* phyla on the seawater-pulsed and on the starved specimens. (3) *Deferribacteres*-affiliated epibionts and other bacterial groups retrieved were unable to metabolise the whole compounds used in the pulse experiments. So, these experiments were identical to a starvation as the seawater pulse. The non-specific bacterial communities were eliminated with the faeces and the non-adapted epibionts were eliminated. (4) *Deferribacteres*-affiliated epibionts were the true dominant gut-resident community. Nevertheless, it was not the case in the early moulted specimens in which three main bacterial communities were retrieved in the RNA analyses: the *Mollicutes*, the *Gamma*- and the *Betaproteobacteria*. These phyla were poorly or not retrieved in the DNA analyses. This result suggested that the active part of the bacterial gut communities in the early moulted shrimps was not the one identified according to the DNA analyses results. This could also be a molecular bias due to the low number of clone treated until now (work in progress). Regarding the RNA analyses results on the reference specimen, data showed the co-occurrence of three active bacterial communities represented by the *Deferribacteres* (52 %), the *Epsilonproteobacteria* (27 %) and the *Mollicutes* (15 %) phyla (Tab.1B). This result might reflect the physiological and chemical condition prevailing *in situ* inside the gut as these molecular analyses were done on a shrimp without any incubation treatment.

Conclusions

Regarding the whole molecular data obtained, we confirmed the hypothesis previously inferred that the *Deferribacteres*, the *Mollicutes* and the *Epsilonproteobacteria* clone sequences represented the resident gut-epibiont communities. We suggested that the activity of the three epibiont communities was partly affected by the environmental conditions. They were active during the anecdysis period of the moult cycle with the *Deferribacteres* being the more active or more competitive community. We hypothesized that in stressful period such as involuntary starvation due to a lack of nutrients in the surrounding environment (represented here by the chemical pulses and starvation experiments) or sudden inappropriate biological condition (represented by the maintenance in pressurized incubator), the resident gut communities were in a latent stage (they were retrieved in the DNA analyses and not in the RNA analyses) except the *Deferribacteres* epibionts which were still very active. Usually, as *Mollicutes* are strictly heterotrophic and auxotrophic micro-organisms, they are dependent of the host for their own needs (Maniloff and Morowitz, 1972; Razin, 1978, 1998; Clark, 1984; Regassa and Gasparich, 2006). The absence of cell division illustrated by the BrdU incorporation experiments strengthened this hypothesis. And finally, during the natural moult process, during which the host ceased feeding but uses the stored energetic compounds, the three resident communities were not affected and were still active. The epibionts activity during the whole moult cycle probably allows the fast “re-colonization” or “re-growth” of this population after each exuviation and so, the persistence of the mutualistic association. The results also showed that the presence of the restricted bacterial diversity retrieved on all specimens represented by the three phyla *Deferribacteres*, *Mollicutes* and *Epsilonproteobacteria*, were not affected by the moult cycle. This confirmed that these epibionts were acquired at an earlier development stage and conserved all along the life of the host. As the filamentous epibionts community was not invasive all along the digestive tract, we suggested that the host could “manage” the bacterial colonization controlling their cell division and growth.

In conclusion, the relationships between *R. exoculata* and the *Deferribacteres*-affiliated, the *Mollicutes*-affiliated and the *Epsilonproteobacteria*-affiliated epibionts could be considered as a mutualistic association. But the study of this biological model has to be completed to understand how and when the epibionts are acquired. A previous work suggested they were vertically-transmitted (Durand et al., *in prep*). So, the study of the early developmental stages such as eggs, larvae and juveniles specimens could be undertaken (in progress).

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.I., 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.
- 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.
- Clark, T. B. (1984) Diversity of *Spiroplasma* host-parasite. *Isr. J. Med. Sci.* **20**:995-997.
- Corbari, L., Zbinden, M., Cambon-Bonavita, M.-A., Gaill, F. and 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.
- Demiri, A., Meziti, A., Papaspyrou, S., Thessalou-Legaki, M. and Kormas, K.A. (2009) Abdominal setae and midgut bacteria of the mudshrimp *Pestarella tyrrhena*. *Cent. Eur. J. Biol.* **4**(4): 558-566.
- Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J.-C., Colaço, A., Comtet, T, Crassous, P., Fouquet, Y., Khripounoff, A., Le Bris, N., Olu, K., Riso, R., Sarradin, P.-M., Segonzac, M. and Vangriesheim, A. (2001) Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep-sea Res. Part I* **48**:1325-1346.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A (2009) Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com/>
- Durand, L., Zbinden, M., Cuff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E.G., Shillito, B. and Cambon-Bonavita M.-A. (2010) Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* **71**:291-303.
- Durand, L., Zbinden, M., Cuff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E.G., Shillito, B. and Cambon-Bonavita M.-A. (*in prep.*) Biogeographical distribution of the *Rimicaris exoculata* gut épibionte communities along the Mid-Atlantic Ridge.
- 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.
- 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.
- 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.

- Harris, J.M. (1993) The presence, nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.* **25**: 195-231.
- Icely, J.D. and Nott, J.A. (1992) Digestion and absorption: digestive system and associated organs. In Harrison, S.W., Humes, A.G. (eds) *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol 10: Decapod crustacea. Wiley-Liss, New York, pp 147-201.
- Lipcius, R.N. and Herrnkind, W.F. (1982) Molt cycle alterations in behavior, feeding and diel rhythms of a decapod crustacean, the spiny lobster *Panulirus argus*. *Mar. Biol.* **68**:241-252.
- Maniloff, J., and Morowitz, H. J. (1972) Cell biology of the *Mycoplasmas*. *Bact. Rev.* **36**:263-290.
- Pinn, E.H., Nickell, L.A., Rogerson, A. and Atkinson, R.J.A. (1999) Comparison of gut morphology and gut microflora of seven species of mud shrimp (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea). *Mar. Biol.* **133**(1): 103-114.
- Posada, D. and Crandall, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**(9):817-818.
- Ravaux, J., Gaill, F., Bris, N.L., Sarradin, P.-M., Jollivet, D., and Shillito, B. (2003) Heat-shock response and temperature resistance in the deep-sea vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *J. Exp. Biol.* **206**:2345-2354.
- Razin, S. (1978) The *Mycoplasmas*. *Microbiol. Rev.* **42**:414-470.
- Razin, S. (1998) Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1094-1156.
- Regassa, L. B., and Gasparich, G. E. (2006) *Spiroplasma* : evolutionnary relationships and biodiversity. *Front. Biosc.* **11**:2983-3002.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- 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 medio-atlantique. *Cah. Biol. Mar.* **34**:535-571.
- Shillito, B., Jollivet, D., Sarradin, P.-M., Rodier, P., Lallier, F., Desbruyeres, D., and Gaill, F. (2001) Temperature resistance of *Hesiolyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker wall. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **216**:141-149.
- 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.

- Vogt, G. (1994) Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreas cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* **114**: 83-101.
- Vogt, G. (1996) Morphology and physiology of digestive epithelia in Decapods crustaceans. *Eur. J. Physiol.* **431**: 239-240.
- 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.
- Zachary, A., and Colwell, R.R. (1979) Gut-associated microflora of *Limnoria tripunctata* in marine creosote-treated wood pilings. *Nature* **282**: 716-717.
- Zachary, A., Parrish, K.K., and Bultman, J.D. (1983) Possible role of marine bacteria in providing the creosote-resistance of *Limnoria tripunctata*. *Mar. Biol.* **75**(1): 1-8.
- Zbinden, M., and Cambon-Bonavita, M.-A. (2003) Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *Microbiol. Ecol.* **46**:23-30.
- Zbinden, M., Le Bris, N., Gaill, F. and 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 Villardi de Montlaur C., Roussel E., Guyot F., Gaill F. and Cambon-Bonavita M.-A. (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.

1.2 - Conclusions de cette étude

Rappel des principaux résultats – Ce travail montre que la composition des communautés microbiennes associées au tractus digestif de *R. exoculata*, constatée par les analyses ADN, ne reflète pas toujours l'activité de ces communautés mise en évidence par les analyses ARN. Les résultats indiquent une dominance des *Deferribacteres* dans les communautés bactériennes actives pour la plupart des spécimens étudiés (référence, pulses chimiques ou jeûne). Cette dominance est cependant moins marquée pour les spécimens de référence chez qui il semble y avoir une co-occurrence de trois communautés bactériennes actives : les *Deferribacteres* (52 %), les *Epsilonproteobacteria* (27 %) et les *Mollicutes* (15 %) tandis que les *Deferribacteres* représentaient 100 % des communautés actives pour les spécimens incubés sous différentes conditions simulées. Ceci peut être lié au fait que le témoin de remontée représente les communautés microbiennes réellement actives *in situ* avec l'ensemble des composés chimiques disponibles.

Les résultats montrent également un effet du stade de mue sur ces communautés. Les épibiontes actifs des spécimens en phase postecdysiale précoce (stade A du cycle de mue, **Fig.42**) semblent être dominés par les *Epsilonproteobacteria* bien que les trois communautés soient présentes.

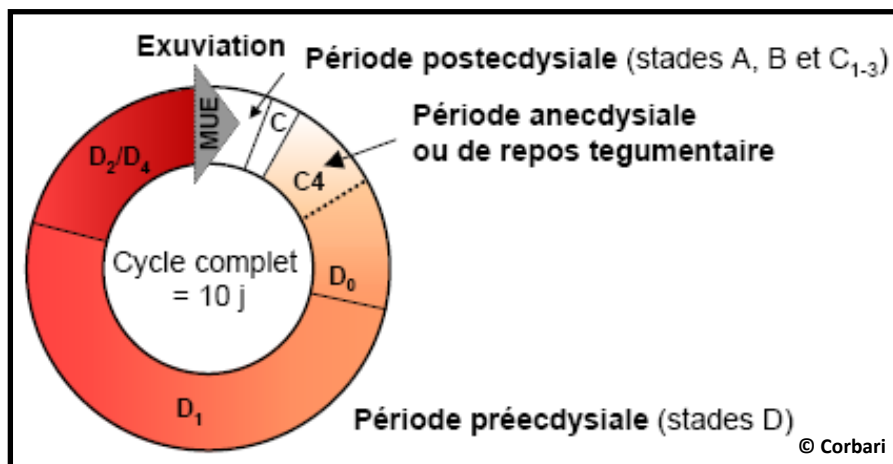


Fig.42 – Représentation schématique du cycle de mue de *Rimicaris exoculata*. L'évolution du dépôt biominéral d'oxydes et sulfures de fer est représentée par le gradient de couleur.

Pour conclure, l'activité des trois communautés microbiennes du tube digestif de *R. exoculata* serait donc affectée par les conditions environnementales et le stade de mue. Les épibiontes affiliés aux *Deferribacteres* seraient la population la plus active et la plus compétitive, quelles que soient les conditions. Les expériences d'incorporation de BrdU révèlent une absence de réplication de l'ADN et les observations microscopiques permettent de dire qu'il n'y a pas de division cellulaire des épibiontes chez les spécimens incubés. En cas de stress de l'hôte (caractérisé dans cette étude par les incubations *in vivo* représentant une carence nutritive et un stress lié à la pression hydrostatique), les

communautés affiliées aux *Mollicutes* et aux *Epsilonproteobacteria* seraient en phase latente laissant supposer une dépendance de ces communautés aux apports fournis par l'hôte et/ou l'environnement *in situ*. Les trois phyla étant retrouvés sur tous les spécimens adultes étudiés, y compris ceux en phase postecdysiale précoce, cela indique qu'ils seraient acquis au cours d'un stade de développement précoce (œuf, larve ou juvénile). Les observations microscopiques confirment que les épibiontes filamenteux sont présents dans le mésentéron quelles que soient les conditions expérimentales (spécimen de référence, pulses chimiques ou jeûne) et le stade de mue. Ils sont retrouvés en population dense mais non invasive dans le mésentéron de tous les individus étudiés. Cela sous-entend un contrôle actif de l'hôte sur l'activité et la croissance des communautés résidentes épibiontes filamenteuses.

[Expériences complémentaires](#) - Pour confirmer les hypothèses de transmission verticale et d'acquisition des communautés épibiontes résidentes, une analyse des stades de développement précoces doit être entreprise. Les stades larvaires constituent un chaînon manquant dans les stades de développement de *R. exoculata* car ils sont difficilement collectés dans les écosystèmes hydrothermaux. Cependant, certains spécimens gravides et des premiers stades juvéniles sont disponibles dans la collection des échantillons collectés au cours des précédentes campagnes océanographiques. Une étude par approches moléculaires et microscopiques est en cours sur des œufs et de individus juvéniles pour rechercher la présence des communautés microbiennes résidentes du tube digestif. Les résultats seront inclus à ce travail pour publication

Des expériences *in vivo* de marquage isotopique en incubateur pressurisé sous différentes conditions chimiques (équivalent aux pulses chimiques étudiés dans ce travail) avaient été réalisées au cours de la campagne océanographique MoMARDREAM-Naut en 2007. Les résultats préliminaires montrent une incorporation des composés marqués (^{14}C) par les communautés microbiennes du tube digestif et tendent à montrer un transfert de matière des épibiontes vers l'hôte. Cela confirmerait l'association mutualiste basée sur des échanges trophiques entre les partenaires. Des expériences d'incorporation sur une durée plus longue permettraient d'obtenir un meilleur marquage.

Chapitre IV

Recherche d'interactions
entre *Rimicaris exoculata*
et les autres micro-organismes :
les micro-organismes *Eucaryota*

CHAPITRE IV

RECHERCHES D'INTERACTIONS ENTRE *RIMICARIS EXOCULATA* ET LES AUTRES MICRO-ORGANISMES : LES MICRO-ORGANISMES *EUCARYOTA*

1 - “Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: diversity and association with fauna” Burgaud et al., 2010 (*FEMS Microbiol. Ecol.*)

1.1- Introduction de l'étude

Contexte scientifique - Les levures sont des micro-organismes eucaryotes ubiquistes qui représentent une part du biotope dans des écosystèmes variés tels que les sols et les environnements aquatiques allant de l'eau douce à l'eau de mer, ces derniers comprenant les eaux de surface et les eaux profondes océaniques. Ces micro-organismes présentent des métabolismes variés utilisant un large spectre de composés organiques simples ou complexes. Ils sont souvent responsables de la dégradation de composés réfractaires comme la cellulose ou la chitine. Ces activités de décomposition de la matière organique jouent un rôle important dans les réseaux trophiques, en redistribuant les éléments entre les organismes vivants et les compartiments environnementaux (Gadd, 2007). L'occurrence des champignons (filamenteux et levures) dans les écosystèmes hydrothermaux marins profonds est peu documentée mais quelques études récentes montrent leur présence dans ces environnements par des approches moléculaires (Edgecomb et al., 2002 ; Lopez-Garcia et al., 2003, 2007) et par des approches culturelles (Gadanhó et Sampaio, 2005 ; Burgaud et al., 2009). Il est donc légitime de penser que les champignons participent à l'équilibre des écosystèmes hydrothermaux en établissant des interactions de diverses natures avec la biocénose et le biotope. La mise en place d'une relation avec un animal favorise très certainement la croissance fongique puisque le champignon pourra se développer dans un environnement plus stable du point de vue des conditions géochimiques que dans l'environnement hydrothermal externe. L'étude des micro-organismes associés à la crevette hydrothermale *R. exoculata* implique donc la recherche d'interactions entre ce crustacé et son environnement, dont font partie les champignons. Cette étude, à laquelle j'ai contribué en collaboration avec l'équipe de G. Barbier (Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESMISAB, Brest, France) représente un travail annexe à mon sujet de doctorat.

Etat de l'art - Les rares études sur les levures inféodées aux écosystèmes hydrothermaux marins profonds sont basées la diversité moléculaire ou cultivable. Les interactions entre ces champignons et la faune hydrothermale commencent à être prises en compte dans la description des écosystèmes hydrothermaux. Mais il n'existe pas encore de travaux relatant ces interactions. C'est pourquoi des cultures de champignons filamenteux ou de levures ont été entreprises à partir d'échantillons hydrothermaux dont des spécimens de *R. exoculata*.

Méthodologie utilisée et résultats obtenus - Les échantillons ont été collectés au cours de diverses campagnes océanographiques sur la ride médio-Atlantique, les bassins sud Pacifique et la ride est-Pacifique. Ils sont de diverses origines : byssus de modioles, crevettes, éponges, coraux, sédiments... Une collection de cultures de 32 isolats, principalement associés à des animaux, a été réalisée. Les analyses phylogénétiques des séquences du gène de l'ARNr 26S ont affilié les souches obtenues aux phyla des *Ascomycota* et des *Basidiomycota*. Les isolats appartiennent aux genres *Rhodotorula*, *Rhodospidium*, *Candida*, *Debaryomyces* et *Cryptococcus*. Ces genres sont couramment isolés à partir d'échantillons provenant d'environnements marins profonds. Les profils obtenus après amplification des séquences de micro satellites (Micro-satellites primed PCR) et les analyses physiologiques révèlent des variations intraspécifiques entre les isolats ce qui suggère différents comportements en milieu marin, notamment au niveau des conditions de croissance. En parallèle, des hybridations *in situ* confirment la présence de levures libres dans les écosystèmes hydrothermaux.

Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna

Gaëtan Burgaud¹, Danielle Arzur¹, Lucile Durand², Marie-Anne Cambon-Bonavita² & Georges Barbier¹

¹Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA3882), IFR 148, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, ESMISAB, Technopole Brest-Iroise, Plouzané, France; and ²Ifremer, Centre de Brest, DEEP/LM2E, UMR 6197, Plouzané, France

Correspondence: Gaëtan Burgaud, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA3882), IFR 148, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, ESMISAB, Technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 2 98 05 61 48; fax: +33 2 98 05 61 01; e-mail: gaetan.burgaud@univ-brest.fr

Received 9 October 2009; revised 16 March 2010; accepted 16 March 2010.

DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.00881.x

Editor: Michael Wagner

Keywords

yeasts; hydrothermal vents; fauna; 26S rRNA gene; FISH.

Introduction

Yeasts are ubiquitous microorganisms that represent a part of the microbiota in all natural ecosystems, such as soils, freshwaters and marine waters from the ocean surface to the deep sea. Marine yeasts are divided into *obligate* and *facultative* groups. Obligate marine yeasts are yeasts that have never been isolated from anywhere other than the marine environment, whereas facultative marine yeasts are also known from terrestrial habitats (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Based on these definitions, Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979) examined yeasts occurring in marine environments and gathered a list of 176 species isolated from diverse marine habitats. Of those, only 25 were obligate marine yeasts, widely represented by the genera *Metschnikowia*, *Rhodospiridium*, *Candida* and *Torulopsis*.

Hawksworth (2002) hypothesized the existence of 1.5 million fungal species; this estimate is now a commonly used and accepted figure. If this is correct, < 5% of the fungi have been described up to now and these almost exclusively from terrestrial environments. In that ecosystem,

Abstract

Investigations of the diversity of culturable yeasts at deep-sea hydrothermal sites have suggested possible interactions with endemic fauna. Samples were collected during various oceanographic cruises at the Mid-Atlantic Ridge, South Pacific Basins and East Pacific Rise. Cultures of 32 isolates, mostly associated with animals, were collected. Phylogenetic analyses of 26S rRNA gene sequences revealed that the yeasts belonged to *Ascomycota* and *Basidiomycota* phyla, with the identification of several genera: *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Candida*, *Debaryomyces* and *Cryptococcus*. Those genera are usually isolated from deep-sea environments. To our knowledge, this is the first report of yeasts associated with deep-sea hydrothermal animals.

fungi are known to utilize a wide spectrum of simple and more complex organic compounds. The decomposition activities of fungi are clearly important in relation to the redistribution of elements among organisms and environmental compartments (Gadd, 2007). Bearing in mind these parameters, our hypothesis is that deep sea and especially hydrothermal vents, which remain underexplored habitats for fungi, could be ecological niches hosting specific fungal communities.

Deep-sea hydrothermal vents are localized at seafloor spreading centers called *riffts*, where seawater seeps into cracked regions caused by the presence of hot basalt and magma. Seawater carrying dissolved minerals is then emitted from springs. Two major types of emissions have been found. Warm fluids diffuse at temperatures of 6–23 °C into seawater at 2–4 °C when hot vents called black smokers emit hydrothermal fluid at 270–380 °C (Munn, 2003). Thermal gradients in hydrothermal vents are so important that just a few centimeters away, the temperature can fall to 2–4 °C, allowing mesophilic or psychrophilic organisms as well as thermophilic and hyperthermophilic prokaryotes to

grow and interact with all biotic or abiotic components of these ecosystems. Dense animal communities cluster around these hot springs. These communities are supported by the chemolithoautotrophic activities of prokaryotes (Joergensen & Boetius, 2007).

The occurrence of fungi (filamentous fungi and yeasts) at deep-sea hydrothermal vents remains an underexplored topic. Over the last few years, interest in the diversity of microbial eukaryotes in these ecosystems has increased, using PCR amplification of SSU rRNA genes and sequence analysis (Edgcomb *et al.*, 2002; Lopez-Garcia *et al.*, 2003, 2007). These papers revealed a scarce fungal diversity, but some sequences were novel. Only two papers have dealt specifically with fungal diversity at deep-sea hydrothermal vents based on culture-dependent methods (Gadanhó & Sampaio, 2005; Burgaud *et al.*, 2009). Culturable yeasts affiliated to *Ascomycota* and *Basidiomycota* phyla were reported from hydrothermal waters. Some papers assessing fungal diversity at deep-sea vents have also been published. Bass *et al.* (2007) reported the presence of sequences affiliated to *Debaryomyces hansenii* and novel sequences similar to *Malassezia furfur* in hydrothermal sediments. Le Calvez *et al.* (2009) reported that fungal diversity from deep-sea vent animals was widely composed of sequences affiliated to *Chytridiomycota* and *Basidiomycota* phyla. The latter phylum was mostly represented by yeasts of, for example, the *Cryptococcus* and *Filobasidium* genera, which form dense clusters.

The occurrence of yeasts in other deep-sea environments has been studied to a much greater extent. Nagahama *et al.* (2001b) reported that culturable fungal diversity was dominated by ascomycetous yeasts in surface sediments in water depths exceeding 2000 m (*Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* and *Williopsis*). Inversely, diversity was dominated by basidiomycetous yeasts on the subsurface of sediments in water depths exceeding 2000 m and by deep-sea clams, tubeworms and mussels (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus* and *Pseudozyma*). Recent studies have clearly demonstrated that *Cryptococcus* was the dominant genus sequenced from sediments collected at deep methane cold seeps (Takishita *et al.*, 2006, 2007). Those observations are in agreement with Bass *et al.* (2007), who suggested that yeast forms dominate fungal diversity in deep oceans. Several yeasts mostly isolated from deep-sea sediments represented new species in the *Ascomycota* or *Basidiomycota* phyla (Nagahama *et al.*, 1999, 2001a, 2003a, b, 2006, 2008).

In this study, we assessed the presence of yeasts at deep-sea hydrothermal vents using a culture-based approach with an emphasis on yeasts interacting with the endemic animal fauna thriving in these extreme ecosystems. A recent paper (Gadanhó & Sampaio, 2005) has dealt with the diversity of yeasts in deep-sea vent waters but, to the best of our knowledge, this is the first report of culturable yeasts

isolated from deep-sea animals. The interactions with the fauna are discussed on the basis of cultures obtained from the samples collected during different oceanographic cruises at the Mid-Atlantic Ridge (MAR), South-west Pacific Lau Basin and East Pacific Rise (EPR).

Materials and methods

Environmental sampling

We collected 210 hydrothermal samples during six oceanographic cruises at several dates and locations (for hydrothermal vents locations, see Tivey, 2007): (1) BIOLAU in the Lau Basin, South-west Pacific (12/05/1989–27/05/1989; 20°3.0'S, 176°7.8'W; –2620 m); (2) DIVANAUT2 (19/06/1994–01/07/1994) on the MAR at Menez Gwen (37°51'N, 31°31'W; –900 m) and Lucky Strike (37°17'N, 32°16'W; –1650 m) hydrothermal sites; (3) HERO on the EPR at Elsa site (30/09/1991–04/11/1991; 12°48'N, 103°57'W; –2630 m); (4) MARVEL (29/08/1997–13/09/1997) on the MAR at Menez Gwen and Lucky Strike sites; (5) EXOMAR (25/07/2005–28/08/2005) on the MAR at Rainbow (36°08'N, 34°00'W; –2300 m), TAG (26°02'N, 44°54'W; –3630 m) and Lost City (30°04'N, 42°12'W; –900 m) sites; (6) MoMARDREAM-Naut (08/07/2007–19/07/2007) on the MAR at Rainbow site. Depending on cruises, deep-sea sampling was performed using the Deep Submergence Vehicle *Nautilie* or the Remote Operated Vehicle (ROV) *Victor 6000* and the N/O *Atalante* and *Pourquoi Pas?* research vessels.

The deep-sea samples were processed as described by Burgaud *et al.* (2009) taking care to avoid contamination by applying strict sterile sampling conditions.

Enrichment conditions and isolation

The samples were processed directly after the *Nautilie* or ROV recovery. The collected samples were mainly composed of deep-sea hydrothermal vent animals (*Rimicaris exoculata* and *Chorocaris chacei* shrimps and *Bathymodiulus azoricus* mussels) and were used to inoculate the GYPS culture medium which had led to the best isolation rate during a previous study (Burgaud *et al.*, 2009). This medium contained per liter: glucose (Sigma) 1 g, yeast extract (AES) 1 g, peptone (AES) 1 g, starch (Fisher) 1 g, sea salts (Sigma) 30 g. This medium was supplemented per liter with agar 15 g and chloramphenicol (Sigma) 500 mg; pH was also adjusted to 7.5. Cultures were done aerobically at 4, 15 and 25 °C (ambient temperature), and at 35 and 45 °C (only during EXOMAR) at atmospheric pressure until fungal strains were visualized. During the MoMARDREAM-Naut cruise, some dissections were done on board on animal samples in order to investigate the yeast location.

Table 1. Culture collection of yeasts from deep-sea hydrothermal vents

Locations (depth)	Sample processed (type)	Strains
South Pacific West (Lau Basin, – 2620 m)	B2E07: seawater surrounding mussels	Bio1
	B9E07: gastropod (<i>Ifremeria nautilei</i>) gills	Bio2
Mid-Atlantic Ridge (Rainbow, – 2300 m)	EX6E01 to EX6E04: <i>Rimicaris exoculata</i>	Ex2–Ex7
	EX6E05: <i>Chorocaris chacei</i>	Ex9, Ex11 and Ex12
	MoPR1: <i>Rimicaris exoculata</i>	Mo20
	MoPR1: <i>Mirocaris fortunata</i>	Mo21
	MoPR2: <i>Rimicaris exoculata</i>	Mo22
	MoPR3: sloughs of shrimp on smoker rocks	Mo24 and Mo25
	MoPR5: colonization module TRAC (carbonates)	Mo26–Mo29
	MoPR6: <i>Bathymodiolus azoricus</i>	Mo30–Mo36
	MoPR8: <i>Rimicaris exoculata</i>	Mo37
	MoPR9: sponge	Mo38 and Mo39
Mid-Atlantic Ridge (Lost City, – 700 m)	MoPR9: coral	Mo40
	EX18E02: siliceous sponge	Ex15

All purified strains from our collection (Table 1) have been integrated to the Souchothèque de Bretagne culture collection (<http://www.ifremer.fr/souchotheque/internet/htdocs/generique.php?pagebody=catalogue.php>) and are available with an accession number associated to their GenBank number.

Physiological characterization and statistical analysis

All experiments were done in triplicate. The yeasts were grown in liquid GYPS broth media. The effect of temperature on growth was determined at 5, 15, 25 and 35 °C at 30 g L⁻¹ sea salts. The effect of salinity was analyzed modifying sea salt concentrations in media from 0 to 60 g L⁻¹ with steps of 15 g L⁻¹ at the optimal temperature for each strain. ODs were measured at 600 nm with Nanocolor 100D (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) at 17, 22, 25 and 28 h of growth for salinity and temperature levels.

DNA extraction and 26S rRNA gene sequencing

DNA of each strain was extracted using FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) specific for fungi and yeasts. Amplifications of the D1/D2 region of 26S rRNA gene were carried out with rRNA gene primers ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3'), LR6 (5'-CGC CAG TTC TGC TTA CC-3'), NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') and NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') as described by Gadanho & Sampaio (2005). All PCR reactions were performed in 20-µL reaction volumes containing 19 µL of 1 × PCR buffer (Promega), 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP (Promega), 0.6 µM of primers (forward and reverse), 1.25 U of Taq DNA Polymerase (Promega) and 1 µL of DNA. The PCRs were performed on PTC-200 (BioRad, France). The amplification consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 2 min,

followed by 30 iterations of 15 s at 94 °C, 30 s at 54 °C, 1 min at 72 °C and a final extension step of 2 min at 72 °C. A negative control with sterile-distilled water replacing DNA was added. Two kinds of amplification were generated using ITS5-NL4 and NL1-LR6 primers. The amplified DNA fragments were separated by electrophoresis in 0.8% agarose (w/v) gel (Promega) in 0.5 × Tris–borate–EDTA buffer at 90 V for 1 h and stained with ethidium bromide. A molecular size marker was used for reference (Lambda DNA/EcoRI+Hind III Markers, Promega). The DNA banding patterns were visualized under UV transillumination and picture files were generated using GEL-DOC 2000 (BioRad).

The sequencing of the D1/D2 region of the 26S rRNA gene was then realized using NL1 on the ITS5-NL4 fragments and NL4 on the NL1-LR6 fragments. The sequences were obtained using Big Dye Terminator technology (Applied Biosystems). This work was done at Biogenouest sequencing facility in the Station Biologique de Roscoff (<http://www.sb-roscoff.fr>).

Phylogenetic analyses

Sequences were edited and cleaned using SEQUENCHER v. 4.8 (Gene Codes). Sequences were then imported to MEGA 4.0 software (Tamura *et al.*, 2007). Each sequence was analyzed to find GenBank sequences with close BLAST-N hits (Altschul *et al.*, 1990). Similarities between sequences were assessed using pairwise distance calculation with MEGA 4.0. The sequences were trimmed to ensure that all sequences had the same start and end point. All the D1/D2 regions of the 26S rRNA gene sequences were aligned using CLUSTALW v. 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). After visual checking and manual curation, an alignment composed of 62 taxa and 579 characters was analyzed for the Bayesian estimation of phylogeny using MRBAYES v. 3.1.2 software (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). A 2-million generation option has been set to run the Metropolis-coupled Monte Carlo Markov

chain (*mcmc*) method. After generation 2 000 000, the SD of split frequencies was $P = 0.005997$, indicating that a convergence had occurred (P -value of < 0.05). The alignment was analyzed using MODELTEST v. 3.7 (Posada & Crandall, 1998) to obtain the more realistic evolutionary model used for phylogenetic analyses (GTR+G model; gamma-distribution shape parameter = 0.3978). Phylogeny was then evaluated using two different methods:

(1) Bayesian inference with MRBAYES v. 3.1.2 analysis was done using 2 000 000 generations and the *mcmc* method. The tree search included two *mcmc* searches with four chains (setting a default temperature for heating the chains) and a sampling frequency of 100 generations. A 'burnin' of 5000 (25% of the 2 000 000 generations/100 sample frequency) was set to exclude the first 5000 trees generated.

(2) Maximum likelihood (ML) with 100 bootstrap iterations was carried out using PHYML (Guindon et al., 2005) and the parameters obtained with MODELTEST v. 3.7. The final phylogenetic tree topology was realized using MRBAYES v. 3.1.2 analysis results. Nodes in the tree show Bayesian posterior probabilities and ML bootstraps, respectively.

Fluorescent probe design and evaluation

For the detection of yeasts isolated from deep-sea vent animals by FISH, we designed oligonucleotide probes using PRIMROSE software (<http://www.bioinformatics-toolkit.org/Primrose/index.html>) as described by Ashelford et al. (2002) with a set of high-quality, full-length rRNA gene sequences of probe target organisms. The PRIMROSE design tool produced oligonucleotide probes for the three principal clusters of our collection (Table 2). These probes exhibited no mismatches with the target organisms but did exhibit mismatches with the next most similar sequences in the GenBank database, proving that the designed probes were highly specific *in silico*. The target sites of newly designed probes were checked for accessibility using the prediction

maps based on the 26S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* (Inacio et al., 2003). Each probe was in a relatively accessible area of the 26S rRNA gene secondary structure (Supporting Information, Fig. S1). As it was not possible to test the probes with culture isolates that exhibited no or one mismatch with the probes, we used an alternative method and tested the probes against all strains from our collection displaying two or more mismatches with the oligonucleotides. All newly designed probes were labelled at the 5' terminus with the fluorescent marker Cy3. All probes were synthesized by Prologo (France) and stored in sterile-distilled water at -20°C . The newly designed probes were checked under *in situ* conditions with target and nontarget species. The universal probe Euk516-Fluorescein (5'-ACCA-GACTTGCCCTCC-3'; Amann et al., 1995) and the non-Euk516-Cy3 (5'-CCTCCCGTTCAGACCA-3') probes were used as positive and negative controls, respectively. The average cell brightness was measured using different formamide concentrations from 0% to 80% with steps of 10%. Systematic evaluation of the signal intensities was done by recording images of independent visual fields (encompassing at least 100 cells), followed by digital image analysis using DAIME software (Daims et al., 2006). During this step, the intensities of the image pixels analyzed, enabled determination of single cell fluorescence in relative units.

FISH

On environmental samples

Interior branchiostegites of *R. exoculata* shrimps and byssus of *B. azoricus* mussels were processed for FISH analyses. Following harvest and dissections, animal subsamples were fixed with 4% paraformaldehyde solution in phosphate-buffered saline (PBS) for 3 h at 4°C in a dark room. After fixation, tissues were washed three times with PBS and

Table 2. Yeast oligonucleotide probes and their sequences, target organisms and binding positions on the 26S rRNA gene

Probe	Hybridization stringency (% formamide)	rRNA subunit, binding position* and relative probe accessibility†	Probe sequence (5'–3')	Target organisms (genus/species)
Sacch	20	26S; 162–177; 44–66%	GGCATCTCATCGCAGC	<i>Debaryomyces</i> , <i>Pichia</i>
MitoFilo	10	26S; 397–412; 60%	ACACCGCAGAACGGCT	Members of the genus <i>Cryptococcus</i> ‡
MitoSporidio	20	26S; 164–179; 44–66%	TGGGCGTCCGCACCAT	Members of the genera <i>Rhodotorula</i> and <i>Rhodospiridium</i> §

*Nucleotide position according to *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA gene between NL1 and NL4 primers.

†According to Inacio et al. (2003).

‡*Cryptococcus saitoi*, *Cryptococcus randhawi*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Cryptococcus adeliensis*, *Cryptococcus vishniacii*, *Cryptococcus socialis*, *Cryptococcus friedmannii* and *Cryptococcus uniguttulatus*.

§*Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*.

stored at -20°C in a storage buffer containing PBS and 96% ethanol (1 : 1).

On membrane filters

The seawater surrounding shrimps (MoMAR08, Rainbow) was sampled in 5-L sterile sampling bags using a peristaltic pump. Immediately after dives, seawater samples for *in situ* hybridizations were mixed with 3% formaldehyde (final concentration) for 2 h at 4°C . Fixed seawater was then filtered on 0.22- μm polycarbonate membranes (Nuclepore[®], 47 mm diameter; Whatman, Maidstone, UK) and rinsed with a PBS 2 \times /sterile seawater (v/v) buffer. Then filters were dehydrated using ethanol series (50%, 80% and absolute, 3 min each). Dried filters were stored at -20°C until hybridization treatments. Three membranes were treated in this study. The filtered volume was 0.8 L for membrane A, 1 L for membrane B and 1.5 L for membrane C. The filtered seawater on membranes A and B was from the same sample.

The samples (environmental samples and membrane filters) were cut in squares and pasted onto slides with one drop of 0.2% low-gelling point agarose ($35\text{--}40^{\circ}\text{C}$) (Menzel-Glaser, Germany). All slides were then dipped in 0.2% agarose and air dried. Samples were then subjected to dehydration with increasing concentrations of ethanol (50%, 80% and 96%, for 3 min each). The concentration of working solutions of probes was 30 ng DNA L^{-1} . The hybridization buffer, containing 0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.03% SDS, and 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% and 80% formamide, and the fluorescent probes were gently mixed in a ratio of 10 : 1 (v/v) to obtain a final oligonucleotide concentration of 3 ng L^{-1} . For hybridization, slides were placed in sampling tubes and incubated at 46°C in the dark for exactly 3 h. Following hybridization, the slides were washed with prewarmed washing buffer [20 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA (pH 8.0) and 900, 450, 215, 102, 46, 18, 5, 0.6 and 0 mM NaCl corresponding, respectively, to 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% and 80% formamide stringencies] for 20 min at 48°C . Slides were rinsed with double-distilled water, air dried, DAPI stained (final concentration $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) and mounted with the antifading reagent Citifluor AF 2 (Citifluor, France) before observation under a fluorescent microscope.

Results

Yeast isolation

Yeasts were not found in all the studied sites (Table 1). No yeast was isolated from samples collected during HERO (on the East Pacific Rise at Elsa site), DIVANAUT2 and MARVEL (Menez Gwen and Lucky Strike) cruises or at TAG site

during the EXOMAR oceanographic cruise. The hydrothermal site that yielded the highest number of isolates was clearly Rainbow (29 isolates from 32 strains). Rainbow is also the site where the highest number of samples was processed (97/210). The yeast collection obtained from deep-sea samples raised 32 isolates that could be divided in pigmented yeasts ($n=18$) and nonpigmented yeasts ($n=14$). Pigmented yeasts consisted mainly of red-pigmented yeasts ($n=16$) with one black-pigmented yeast and one brown-pigmented yeast.

Regarding yeast isolation vs. type of substrate, strains were obtained mostly from hydrothermal shrimps *R. exoculata* ($n=11$), *C. chacei* ($n=3$) and *Mirocaris fortunata* ($n=1$), and from hydrothermal mussels *B. azoricus* ($n=7$). Carbonate colonization modules deployed for 1 year near Rainbow vent yielded a few yeasts ($n=4$); and three yeasts were isolated from sponges. One strain each was obtained from seawater, gastropod and coral samples (Table 1). These results indicate that the yeasts were associated much more with animals than with mineral substrates. Statistical distribution tests were performed to determine the distribution type of yeasts in hydrothermal sites. The variance to mean ratio (s^2/m) was calculated for each site (Cancela da Fonseca, 1966). Values of s^2/m significantly different from 1 correspond to $(s^2/m) - 1 > 2[2n/(n-1)]^{1/2}$ and were obtained only for the Rainbow site. For this hydrothermal site, an aggregate distribution was observed ($s^2/m = 1.32$), indicating that the culturable yeasts isolated were located in specific niches in this hydrothermal site (mainly shrimps and mussels).

During the MoMARDREAM-Naut cruise, dissections of body components were processed for all shrimps (branchiostegites, scaphognathites, exopodites, gills, stomach and digestive tract) and mussels (interior and external faces of shells) to investigate the localization of yeasts in deep-sea animals. For shrimps, a large majority of strains were grown from the inner side of the branchiostegites, which can be divided into three different compartments: (1) an antero-ventral area, which was relatively clear; (2) a posterior area, which always remained light beige; and (3) an antero-dorsal area, with an intensely rusty coloration (for schematic views, see Zbinden *et al.*, 2004; Corbari *et al.*, 2008). Yeast isolates from this study were all cultivated from the antero-dorsal area, which was characterized by high amounts of minerals and a dense bacterial mat.

Seven yeasts were also isolated from *B. azoricus* during the MoMADREAM-Naut oceanographic cruise (Table 1). Six of them were cultivated from the external face of the mussel shells, more precisely from the byssus, which is a network of filaments that allows attachment to rocks. This tangle gathers many particles and organic matter in decomposition (G. Burgaud, personal observation). Only one yeast was isolated from the interior of a mussel (Mo32).

Physiological analysis

Three categories of strains were identified (Table 3) based on the definition of halotolerant and halophilic microorganisms (Kushner, 1978; Margesin & Schinner, 2001). Nonhalophiles are strains with maximal growth without sea salts and a decreasing growth rate with increasing concentrations of sea salts in media. Halotolerant yeasts are strains able to grow in the absence as well as in the presence of salt. Halophiles require salt for an optimal growth. Regarding halophily, optimal salinities, optimal temperatures and OD measurement, nine physiological groups were defined. Most of the isolated strains were nonhalophiles (23 strains) and halotolerant (two strains, maximal OD at 30 g L⁻¹ sea salts) growing efficiently at an optimal temperature of 25 °C. Four strains had poor maximal growth at 25 °C, including one nonhalophile, two halotolerant (maximal OD at 30 and 60 g L⁻¹ sea salt) and one halophile (maximal OD at 30 g L⁻¹ sea salt). Three strains had maximal and efficient growth at 35 °C, including one nonhalophile, one halotolerant (maximal OD at 45 g L⁻¹ sea salts) and one halophile (maximal OD at 30 g L⁻¹ sea salts).

Identification

A sequence analysis of the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene was done to identify species (Fig. 1). Twelve phylotypes were found among the collection of yeasts isolated from deep-sea hydrothermal vents. Eleven phylotypes could be assigned to a known yeast species and one represents a new yeast species.

Within *Basidiomycota*, the *Sporidiobolales* order was the dominant cluster, comprising 16 strains. The majority of strains (Ex2, Ex3, Ex4, Ex5, Ex6, Ex7, Ex9, Ex11, Ex12, Mo32, Mo35 and Mo37) were identified as *Rhodotorula mucilaginosa* (100% similarity). Most of the *R. mucilaginosa* were isolated from deep-sea shrimps ($n = 14$) and the others from deep-sea mussels ($n = 2$). As a member of the *Sporidiobolales* order, isolates affiliated to *Rhodospiridium diobovatum* were also isolated (Mo24, Mo33 and Mo38) with 100% similarity. These three strains were isolated, respec-

tively, from *R. exoculata* exuviae in decomposition on smoker rocks, *B. azoricus* and a sponge. One strain isolated from *R. exoculata* was identified as *Sporobolomyces roseus* based on 26S rRNA genes (Mo22) with 100% similarity with the reference strain. Four strains (Mo26, Mo27, Mo28 and Mo29) were affiliated to the *Filobasidiales* order and identified as *Cryptococcus uzbekistanensis* (100% similarity). These four strains were all isolated from a carbonate colonization module. Finally, one isolate (Mo36) from *B. azoricus* mussel was identified as *Leucosporidium scottii* in the *Leucosporidiales* order.

The *Ascomycota* phylum contained nine strains belonging to the *Saccharomycetales* order. Within this order, four strains (Mo20, Mo21, Mo40 and Bio2) isolated, respectively, from *R. exoculata*, *M. fortunata*, a deep-sea coral and the gills of the gastropod *Ifremeria nautilei* were identified as *D. hansenii* (100% similarity). *Candida atlantica* isolates were found in *R. exoculata* exuviae in decomposition (Mo25) and *B. azoricus* (Mo31). One strain isolated from a deep-sea sponge (Ex15) was identified as *Pichia guilliermondii* (100% similarity). Finally, among the *Saccharomycetales* order, one strain was identified as *Candida viswanathii* (Bio1) with 100% similarity. One halophilic strain (Mo39) isolated from a deep-sea coral represents a new species in the *Candida* genus and thus was identified as *Candida* sp. This strain has 95% similarity with the reference sequence of *Candida atmosphaerica* (23 mismatches on 505 bp). Mo30 isolated from *B. azoricus* was identified as *Phaeothea triangularis* (mitosporic *Ascomycota*) with 100% similarity. In the *Dothideales* order, one strain (Mo34) isolated from *B. azoricus* was identified as *Hortaea werneckii* with 99.98% similarity (one mismatch on 560 bp).

Sequencing of the 26S rRNA genes indicated the presence of *Ascomycota* and *Basidiomycota* in our culture collection. There were twice as many of the *Basidiomycota* phylum ($n = 21$) as of the *Ascomycota* phylum ($n = 11$). In terms of species richness, ascomycetous yeasts belonged to seven different clusters, whereas basidiomycetous yeasts belonged to five.

Table 3. Physiological analysis of the yeast collection

	Optimum (g L ⁻¹)	Low OD (< 1.1)		High OD (> 2.0)	
		25 °C	25 °C	25 °C	35 °C
Nonhalophilic	0–15	Mo25	Bio1, Bio2, Ex2, Ex3, Ex4, Ex5, Ex6, Ex7, Ex9, Ex11, Ex12, Mo20, Mo21, Mo24, Mo26, Mo27, Mo28, Mo29, Mo31, Mo32, Mo33, Mo35, Mo40		Ex15
Halotolerant	30	Mo36	Mo37, Mo38		
	45				Mo30
Halophilic	60	Mo22			
	30	Mo34			Mo39

This table shows distribution of halotolerant and halophilic strains of the collection depending on their optimal salinities (g L⁻¹ sea salt), optimal temperatures (°C) and maximal ODs of cultures on GYPS broth medium (120 r.p.m. on a rotary shaker) measured at 600 nm at four different incubation times (17, 22, 25 and 28 h).

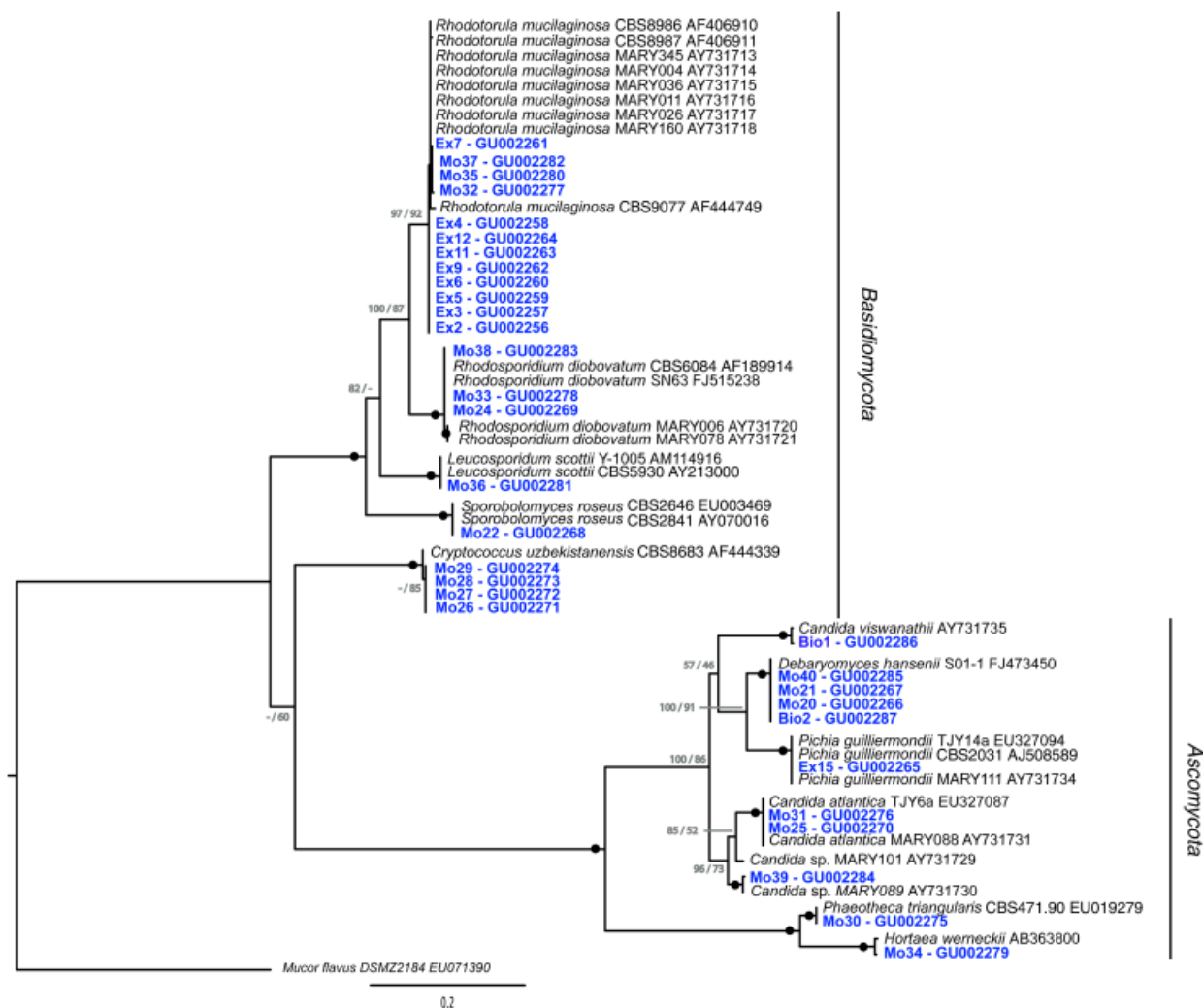


Fig. 1. Phylogenetic tree of deep-sea yeast isolates and close relatives obtained by analysis of the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene. Topology was built using MRBAYES v. 3.1.2 from a CLUSTALW 1.83 alignment. Node support values are given in the following order: MRBAYES posterior probabilities/PHYML 100 bootstraps. Black circles represent nodes supported by an excess of 0.95 posterior probabilities and 95% bootstraps. *Mucor flavus* (EU071390) belonging to the *Zygomycota* phylum was used as outgroup. All sequences are listed with their GenBank accession numbers.

FISH

We processed numerous assays to detect fungi on deep-sea hydrothermal vent animal samples using different existing fluorescent probes from different databases. The Euk516-Cy3 probe gave positive results on pure cultures but strong background fluorescence on hydrothermal samples, and so was not used. The probe MY1574 targeting *Eumycota* organisms (Baschien *et al.*, 2008) showed very weak fluorescence on pure cultures. We therefore decided to design our own probes (Table 2) based on our culture collection, divided into three main clusters: MitoFilo (*Cryptococcus*/Mitosporic *Filobasidiales* order), MitoSporidio (*Rhodotorula*, *Rhodosporidium*/Mitosporic *Sporidiobolales* order) and Sacch (*Debaryomyces*, *Pichia*/Saccharomycetales order). These

probes revealed a strong specificity for the target organisms. The optimal conditions for the *in situ* hybridization protocol used stringent conditions of 20% formamide (Fig. S1).

Our aim was to check the applicability of the FISH method to the *in situ* detection of yeasts in deep-sea hydrothermal fauna samples. Hydrothermal body components of endemic shrimps (*R. exoculata*) and mussels (*B. azoricus*) were fixed for FISH experiments directly after dissection. The pieces of shrimps and mussels from which the highest number of fungi were isolated (interior branchiostegites of shrimps and byssus of mussels) were analyzed for yeast cell fluorescence. Although shrimp and mussel samples from Rainbow site led to the highest rate of isolation, no FISH signal was ever observed. The FISH detection limit of 10^3 – 10^4 target cells mL^{-1} is relatively high

(Daims *et al.*, 2005) and thus the absence of FISH signals does not necessarily mean that the target organisms were not present in the samples.

To test this hypothesis, several volumes of water were concentrated on polycarbonate membrane filters to yield sufficient cells for FISH experiments with these new probes. Membrane filters were embedded in low gelling-point agarose to minimize cell loss. A small quantity of yeast cells could be visualized on these membrane filters (Fig. 2). Such results provide further evidence of the presence of yeast cells in hydrothermal vents, albeit at low concentrations. Using FISH on membrane filters, the yeast cells detected were affiliated to three genera: *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* and *Cryptococcus*.

Discussion

Occurrence of yeasts in deep-sea hydrothermal vents

In this study, the main aim was to isolate yeast strains from deep-sea hydrothermal endemic fauna, knowing that yeasts can be isolated from seawater surrounding hydrothermal fauna (Gadanhó & Sampaio, 2005). Yeast isolation was

successful, although the retrieved species richness was relatively low. Thirty-two strains were isolated mostly from *R. exoculata* shrimps. The association with shrimps is probably favorable for yeasts, which can benefit from nutrients due to the water circulation in the gill chamber. Most of our strains were isolated from the Rainbow hydrothermal site, which confirms previous results (Gadanhó & Sampaio, 2005). The Rainbow hydrothermal field hosted in ultramafic rocks is a unique vent rich in CH₄, H₂, CO and Fe, and deficient in H₂S (Charlou *et al.*, 2002). The high yeast isolation ratio may indicate that yeasts thrive in hydrothermal sites depleted of H₂S. The isolation rate of nonpigmented yeasts on sulfur-free media was significantly higher than those on sulfur-based media in a previous study (Gadanhó & Sampaio, 2005), which supports such a hypothesis.

Several yeasts were also isolated from mussels, and more precisely from the byssus, which is composed of filaments with a high concentration of minerals and organic matter. These yeasts may have a role in the decomposition of organic material entrapped in mussel byssi in deep-sea vents. These results seem promising as they confirm the data obtained in previous studies and suggest that yeasts may interact with deep-sea hydrothermal vent fauna.

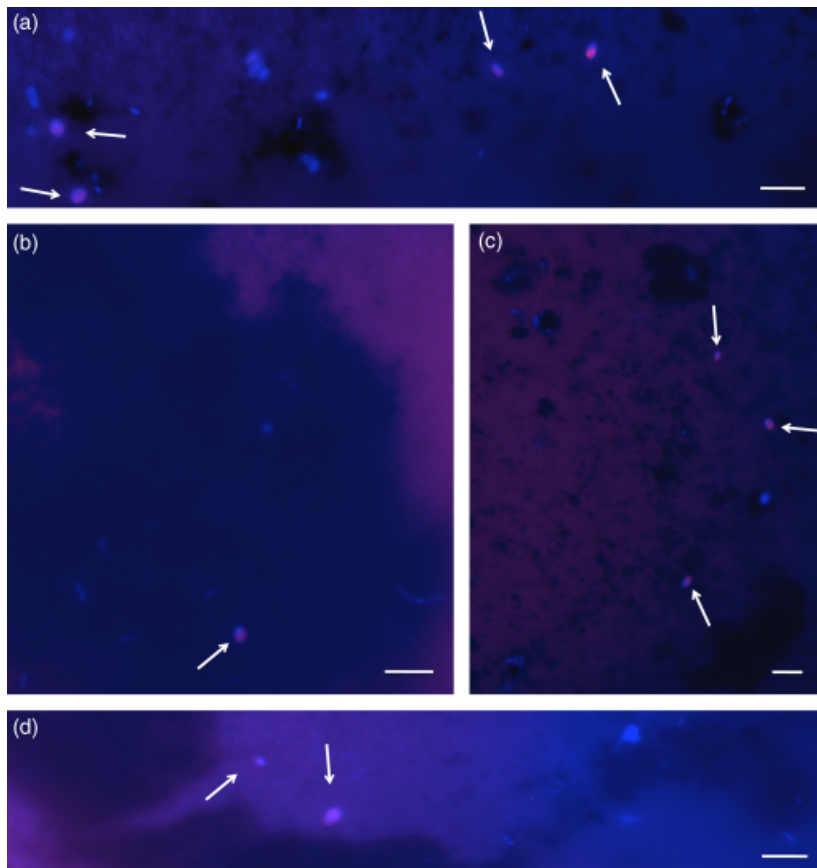


Fig. 2. FISH with specific oligonucleotide probes on membrane filters. (a–c) Membrane filter labelled with DAPI and hybridized using MitoSporidio probe indicating the presence of bacteria and yeast cells (blue). Yeasts belonging to *Rhodotorula* and *Rhodospiridium* genera are visualized in pink (composite of blue and red). (d) Membrane filter labelled with DAPI and hybridized with MitoFilo indicating the presence of yeasts belonging to *Cryptococcus* genera. White arrows indicate the yeast cells.

Pattern of the culturable yeast communities

New species

The yeast that was first isolated from stomach of a marine fish was described as *D. hansenii* and deposited in the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 5307) database. In a recent paper, based on the intergenic spacer region of the rRNA gene, this strain was reevaluated as *Candida* sp. (Nguyen *et al.*, 2009). This strain is identical to another isolated from deep-sea hydrothermal vent waters and annotated MARY089 (Gadanhó & Sampaio, 2005). These two strains isolated from different marine environments were finally reported as a single new undescribed species within the *Candida* genus. In our collection, strain Mo39, isolated from deep-sea coral near Rainbow hydrothermal vents (Table 1), has the same 26S rRNA gene sequence as CBS 5307 and MARY089. Mo39 is halophilic and is therefore supposed to be an autochthonous marine yeast species. This new ecotype can be characterized as an obligate marine yeast and its complete description is currently being investigated.

Known species

Two strains (Mo25 and Mo31) isolated from *R. exoculata* and *B. azoricus* samples were identified as *C. atlantica*. This result seems in keeping with previous published studies that have isolated this species from coastal seawater in the south of Portugal (Gadanhó *et al.*, 2003) and in deep-sea hydrothermal vent waters (Gadanhó & Sampaio, 2005). The very first *C. atlantica* strain was isolated from shrimp eggs in the North Atlantic Ocean (Siepmann & Höhnk, 1962). *Candida atlantica* appeared to be a marine obligate yeast and some interactions with shrimps seemed to occur. Our physiological analysis revealed that Mo25 and Mo31 are nonhalophiles. This does not mean that they are unable to grow in marine environments; they may have a role in deep-sea environments in interaction with endemic crustaceans even if the growth conditions are not optimal. One isolate (Bio1) isolated from seawater surrounding mussels at Lau Basin in the South-west Pacific was clearly identified as *C. viswanathii*. Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979) characterized this yeast as marine facultative. More recently, *C. viswanathii* was isolated from a shrimp (*Penaeus braziliensis*) in the Gulf of Mexico. Under the synonym *Candida lodderae*, this yeast was recently reported in deep-sea hydrothermal vent waters at Rainbow site (Gadanhó & Sampaio, 2005) and characterized as the most abundant yeast.

Leucosporidium scottii isolates (Mo36) have been retrieved only in the oceanic regions close to Antarctica and are known to be psychrophilic and probably autochthonous marine species (Lachance & Starmer, 1998). Such strains, which are known for their presence in cold polar marine

environments, could be further evidence of global exchanges from polar environments to deep-sea vents based on results from bacteria (Maruyama *et al.*, 2000) and filamentous fungi (Burgaud *et al.*, 2009). *Hortaea werneckii* (Mo34) was characterized as halophilic in our physiological study. This is not surprising, as this black yeast-like fungus was characterized as halophilic or extremely halotolerant in different studies (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000; Kogej *et al.*, 2005) where it has frequently been isolated from hypersaline waters of solar salterns. In a molecular survey, *H. werneckii* was identified (based on internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene) in deep-sea methane seep sediments at a depth of 2965 m (Lai *et al.*, 2007). *Phaeotheca triangularis* (Mo30) has also frequently been isolated from salt environments (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000) and characterized as halophilic. This confirmed previous results on *P. triangularis* showing a better growth with 5% additional salts (Zalar *et al.*, 1999). In our study, Mo30 was characterized as halotolerant with 4.5% sea salt optimal concentration and thus hypothesized to be a marine-adapted yeast. This is the first report of the presence of *P. triangularis* at deep-sea vents.

Mo22 is described as *S. roseus*. The genus *Sporobolomyces* is composed of strains mainly isolated from the phyllophane (Bai *et al.*, 2002). However, a previous study has shown that strains of the genus *Sporobolomyces* are frequently isolated from marine ecosystems, with the frequency of isolation increasing with increasing distance from the coastline and depth (Hernandez-Saavedra *et al.*, 1992). Moreover, yeasts from this genus were found in benthic invertebrates collected from the deep-sea floor in the Pacific Ocean (Nagahama *et al.*, 2001b). Our strain was isolated from a deep-sea hydrothermal shrimp in the Atlantic Ocean and characterized as halotolerant with an optimal salinity of 6% sea salts. This may indicate that yeasts of this genus are also able to live in deep-sea vents and interact with endemic crustaceans.

A previous study of yeasts in oceanic environments (Fell, 1976) reported that yeast communities appeared to be composed of ubiquitous and endemic species. Typical ubiquitous strains were the ascomycetous yeast *D. hansenii* and the basidiomycetous yeasts *Cryptococcus* and *Rhodotorula*. Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979) confirmed this statement and characterized these genera as mainly facultative marine yeasts. Some of these results, especially for *Rhodotorula* yeasts showing a strong ubiquity, were confirmed based on their presence in several habitats such as deep-sea vents (Gadanhó & Sampaio, 2005), deep-sea sediments (Nagahama *et al.*, 2001b), coastal waters (Gadanhó *et al.*, 2003; Gadanhó & Sampaio, 2004) and oligotrophic lakes (Libkind *et al.*, 2003). Our results confirm their ubiquity and indicate that these strains seem to be allochthonous. Strain Ex15 identified as *P. guilliermondii* has also been characterized as nonhalophilic and may be another allochthonous yeast strain, as reported by Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979).

The members of the genus *Rhodospiridium* have been characterized as nonhalophiles (Mo24 and Mo33) and halotolerant (Mo38). Based on previous reports, this genus seemed to be restricted to marine environments (Gadanhó & Sampaio, 2005). *Rhodospiridium diobovatum* in deep-sea vents seemed to be able to colonize different substrates (shrimps, mussels and sponges). The isolation of a strain from shrimp exuviae in decomposition may indicate a role as a recycler of organic material and so a probable implication in the carbon cycle in deep-sea environments.

Adaptation to marine conditions

The isolation of culturable yeasts has led to an old question about marine yeasts: 'Are there any indigenous marine yeasts?' (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979) and to the consequent question, 'Which are the indigenous species?'. Based on our results, one can suggest that halophilic strains are marine indigenous yeasts and that others, halotolerant and nonhalophiles, are ubiquitous terrestrial strains present in deep-sea waters due to sedimentation or other natural or anthropogenic phenomena. But almost all yeast species can grow well in media with NaCl concentrations exceeding those normally present in seawater (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Few yeast species with a physiological dependence on NaCl or other seawater components have been reported (Nagahama, 2006). Thus, our results appear to be in good agreement with such statements. Only two strains described as halophiles (Mo34 and Mo39) in our study can be described as obligate marine yeasts.

FISH observations

FISH using labelled oligonucleotide probes targeting rRNA has been used as a powerful technique for assessing both microbial identity and spatial distributions *in situ* in complex environmental contexts (Yang *et al.*, 2008). Our results indicate a very low level of yeasts at deep-sea vents. As a first conclusion, regarding diversity and quantification (added to previous results of Gadanhó & Sampaio, 2005), it seems that yeasts at deep-sea vents represent a minor community that may not be major actors in biogeochemical cycles. However, fluorescent signals are correlated to the cellular content of ribosomes and consequently to the microbial growth rates. Recently, the detection limits of conventional FISH with Cy3-labelled probe EUB338 were found to be approximately 370 16S rRNA gene molecules per cell for *Escherichia coli* hybridized on glass microscope slides and 1400 16S rRNA gene copies per *E. coli* cell in environmental samples (Hoshino *et al.*, 2008). So, in addition to a low concentration of yeast cells, low detection of yeasts may be caused by low ribosome content of most yeasts in the deep-sea environment due to low-level metabolic activities of yeasts living under extreme environmental abiotic factors (high

hydrostatic pressure, low temperatures, etc.). Our attempts to cultivate the yeast strains in this study at elevated hydrostatic pressure have been successful, but ribosomal activities were lower at high hydrostatic pressure than at atmospheric pressure. Such results may account for the low fungal detection using FISH (G. Burgaud, unpublished data). Consequently, when using FISH alone, care must be taken when dealing with diversity and biomass estimations.

The quantification of yeasts using FISH has been impossible due to a nonhomogeneous repartition of microorganisms on filters. Moreover, bacterial and yeast cells were only visible in some regions of the filters without minerals due to strong autofluorescence. However, we can say that yeast concentrations are really low, as shown by the few cells visualized after filtration of seawater surrounding shrimps. This result is in keeping with the relatively low diversity revealed by Gadanhó & Sampaio (2005), ranging from 0 to 10 CFU L⁻¹ for pink yeasts and from 0 to 6000 CFU L⁻¹ for nonpigmented yeasts. To better analyze the fungal presence in deep-sea animals, one could work with phylum-specific probes on histological sections of animals and use the CARD-FISH (Amann & Fuchs, 2008) or the DOPE-FISH (Stoecker *et al.*, 2010) methods to amplify probe signals.

These data raise new questions regarding the ecological role of such microorganisms in deep-sea vents as well as the old question of the ubiquity or endemism of those strains. Yeasts at deep-sea vents may be facultative parasites or opportunistic pathogens of endemic deep-sea animals, as has already been hypothesized in previous work (Van Dover *et al.*, 2007; Burgaud *et al.*, 2009). However, they may also play a role in the decomposition of abundant organic material.

Considering all the results obtained, we can say that yeasts appear to interact with deep-sea hydrothermal endemic fauna even at low densities. These yeasts are mainly composed of ubiquitous species, but obligate marine yeasts have also been harvested. However, the results obtained using *in situ* hybridization have allowed us to visualize these ubiquitous species, showing that they are able to live and grow in deep-sea hydrothermal vents. Yeasts associated with endemic animals in deep-sea vents may be exposed to favorable conditions and could benefit from a stable source of nutrients (Nagahama *et al.*, 2001b). Yeasts were reported from dead and healthy individuals, which may also indicate their facultative saprophytism and so emphasize the wide role of fungi in the decomposition of organic matter from terrestrial environments to deep-sea hydrothermal vents. Even if yeasts were isolated from animal body components, they were not visualized using FISH. To better understand the interaction with animals and fungi in deep-sea vents, we need to work on tissues, as done in Van Dover *et al.* (2007), and also with probes specific to fungal phyla (*Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Chytridiomycota*). In conclusion, several

questions regarding the role of yeasts in deep-sea hydrothermal vents and the endemism or ubiquity of the isolated yeasts remain difficult, with no clear answers. The culture of these yeasts under high hydrostatic pressures would be an interesting study to better characterize their lifestyle and role at deep-sea vents.

Acknowledgements

We thank the chief scientists of the BIOLAU, DIVANAUT2, HERO, MARVEL, EXOMAR and MoMARDREAM-Naut cruises, the pilots and support crews of the oceanographic vessels and Deep Submergence Vehicles of Ifremer. We greatly acknowledge Dr Jerome Mounier for his valuable help and comments on FISH and Jerome Lepioufle for valuable advice on the manuscript. We thank all the members of the GDR Ecchis for their advice and suggestions. We would like to thank the editor and the anonymous reviewers who have provided helpful comments on the refinement of this manuscript. We also thank ANR Deep-Oases, Ifremer, Region Bretagne and French Research Ministry for their financial support. We finally thank Françoise Gaill and the CHEMECO/European Science Foundation EURODEEP for discussions and financial support.

References

- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E & Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Amann RI & Fuchs BM (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* **6**: 339–348.
- Amann RI, Ludwig W & Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143–169.
- Ashelford KE, Weightman AJ & Fry JC (2002) PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Res* **30**: 3481–3489.
- Bai F, Zhao JH, Takashima M, Jia JH, Boekhout T & Nakase T (2002) Reclassification of the *Sporobolomyces roseus* and *Sporidiobolus pararoseus* complexes, with the description of *Sporobolomyces phaffii* sp. nov. *Int J Syst Evol Micr* **52**: 2309–2314.
- Baschien C, Manz W, Neu T, Marvanova L & Szewzyk U (2008) *In situ* detection of freshwater fungi in an alpine stream by new taxon-specific fluorescence *in situ* hybridization probes. *Appl Environ Microb* **74**: 6427–6436.
- Bass D, Howe A, Brown N *et al.* (2007) Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. *P R Soc B* **274**: 3069–3077.
- Burgaud G, Le Calvez T, Arzur D, Vandenkoornhuysse P & Barbier G (2009) Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol* **11**: 1588–1600.
- Cancela da Fonseca JP (1966) L'outil statistique en biologie du sol. III. Indices d'intérêt écologique. *Rev Ecol Biol Sol* **3**: 381–407.
- 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 (36j14VN, MAR). *Chem Geol* **191**: 345–359.
- 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.
- Daims H, Stoecker K & Wagner M (2005) Fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of prokaryotes. *Advanced Methods in Molecular Microbial Ecology*, (Osborn AM & Smith CJ, eds), pp. 213–239. BIOS Scientific Publishers, Abingdon, UK.
- Daims H, Lückner S & Wagner M (2006) *daime*, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ Microbiol* **8**: 200–213.
- Edgcomb VP, Kysela DT, Teske A & de Vera Gomez A (2002) Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *P Natl Acad Sci USA* **99**: 7658–7662.
- Fell JW (1976) Yeasts in oceanic regions. *Recent Advances in Aquatic Mycology* (Jones EBG, ed), pp. 93–124. Elek Science, London.
- Gadanhó M & Sampaio JP (2004) Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. *FEMS Yeast Res* **5**: 253–261.
- Gadanhó M & Sampaio J (2005) Occurrence and diversity of yeasts in the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fields near the Azores archipelago. *Microb Ecol* **50**: 408–417.
- Gadanhó M, Almeida JM & Sampaio JP (2003) Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**: 217–227.
- Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* **111**: 3–49.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P & Gascuel O (2005) PHYML online – a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* **33**: 557–559.
- Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog S & Plemenitas A (2000) Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 235–240.
- Hawksworth DL (2002) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* **105**: 1422–1432.
- Hernandez-Saavedra NY, Hernandez-Saavedra D & Ochoa JL (1992) Distribution of *Sporobolomyces* (Kluyver et van Niel

- genus in the western coast of Baja California Sur, Mexico. *Syst Appl Microbiol* **15**: 319–322.
- Hoshino T, Yilmaz LS, Noguera DR, Daims H & Wagner M (2008) Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Appl Environ Microb* **74**: 5068–5077.
- Joergensen BB & Boetius A (2007) Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Microbiol* **5**: 770–781.
- Kogej T, Ramos J, Plemenitas A & Gunde-Cimerman N (2005) The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Appl Environ Microb* **71**: 6600–6605.
- Kohlmeyer J & Kohlmeyer E (1979) *Marine Mycology: The Higher Fungi*. Academic Press, New York.
- Inacio J, Behrens S, Fuchs BM, Fonseca A, Spencer-Martins I & Amann R (2003) *In situ* accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Appl Environ Microb* **69**: 2899–2905.
- Kushner DJ (1978) Life in high salt and solute concentrations. *Microbial Life in Extreme Environments* (Kushner DJ, ed), pp. 317–368. Academic Press, London.
- Lachance MA & Starmer WT (1998) Ecology and yeasts. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 21–30. Elsevier, Amsterdam.
- Lai X, Cao L, Tan H, Fang S, Huang Y & Zhou S (2007) Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea. *ISME J* **1**: 756–762.
- Le Calvez T, Burgaud G, Mahe S, Barbier G & Vandenkoornhuysen P (2009) Fungal diversity in deep sea hydrothermal ecosystems. *Appl Environ Microb* **75**: 6415–6421.
- Libkind D, Brizzio S, Ruffini A, Gadanho M, van Broock M & Sampaio JP (2003) Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**: 313–322.
- Lopez-Garcia P, Philippe H, Gail F & Moreira D (2003) Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *P Natl Acad Sci USA* **100**: 697–702.
- Lopez-Garcia P, Vereshchaka A & Moreira D (2007) Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid–seawater interface in Lost City hydrothermal field. *Environ Microbiol* **9**: 546–554.
- Margesin R & Schinner F (2001) Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* **5**: 73–83.
- Maruyama A, Honda D, Yamamoto H, Kitamura K & Higashihara T (2000) Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microb* **50**: 835–846.
- Munn CB (2003) *Marine Microbiology – Ecology and Applications*. Bios-Garland Scientific, Oxford.
- Nagahama T (2006) Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (The Yeast Handbook series)* (Rosa CA & Péter G, eds), pp. 241–262. Springer, Berlin & London.
- Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T & Horikoshi K (1999) *Kluyveromyces nonfermentans* sp. nov., a new yeast species isolated from the deep sea. *Int J Syst Evol Microb* **49**: 1899–1905.
- Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T & Horikoshi K (2001a) *Rhodotorula lamellibrachii* sp. nov., a new yeast species from a tubeworm collected at the deep-sea floor in Sagami Bay and its phylogenetic analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* **80**: 317–323.
- Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T, Takami H & Horikoshi K (2001b) Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek* **80**: 101–110.
- Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T & Horikoshi K (2003a) *Rhodotorula benthica* sp. nov. and *Rhodotorula calyptogenae* sp. nov., novel yeast species from animals collected from the deep-sea floor, and *Rhodotorula lysiniphila* sp. nov., which is related phylogenetically. *Int J Syst Evol Microb* **53**: 897–903.
- Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T, Takaki Y & Horikoshi K (2003b) *Cryptococcus surugaensis* sp. nov., a novel yeast species from sediment collected on the floor of Suruga Bay. *Int J Syst Evol Microb* **53**: 2095–2098.
- Nagahama T, Hamamoto M & Horikoshi K (2006) *Rhodotorula pacifica* sp. nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep-sea floor of the north-west Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microb* **56**: 295–299.
- Nagahama T, Abdel-Wahab MA, Nogi Y, Miyazaki M, Uematsu K, Hamamoto M & Horikoshi K (2008) *Dipodascus tetrasporus* sp. nov., an ascosporegenous yeast isolated from deep-sea sediments in the Japan Trench. *Int J Syst Evol Microb* **58**: 1040–1046.
- Nguyen H, Gaillardin C & Neuvéglise C (2009) Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flareri* (= *D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*. *FEMS Yeast Res* **9**: 641–662.
- Posada D & Crandall K (1998) Applications note. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817–818.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Siepmann R & Höhnk W (1962) Über Hefen und einige Pilze (Fungi imp., Hyphales) aus dem Nordatlantik. *Veroeff Inst Meeresforsch Bremerhaven* **8**: 79–97.
- Stoecker K, Dorninger C, Daims H & Wagner M (2010) Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Appl Environ Microb* **76**: 922–926.
- Takishita K, Tsuchiya M, Reimer JD & Maruyama T (2006) Molecular evidence demonstrating the basidiomycetous

- fungus *Cryptococcus curvatus* is the dominant microbial eukaryote in sediment at the Kuroshima Knoll methane seep. *Extremophiles* **10**: 165–169.
- Takishita K, Yubuki N, Kakizoe N, Inagaki Y & Maruyama T (2007) Diversity of microbial eukaryotes in sediment at a deep-sea methane cold seep: surveys of ribosomal DNA libraries from raw sediment samples and two enrichment cultures. *Extremophiles* **11**: 563–576.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software, version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596–1599.
- Tivey MK (2007) Generation of seafloor hydrothermal vent fluids and associated mineral deposits. *Oceanography* **20**: 50–65.
- 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.
- Van Dover CL, Ward ME, Scott JL, Underdown J, Anderson B, Gustafson C, Whalen M & Carnegie RA (2007) A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent. *Mar Ecol* **28**: 54–62.
- Yang L, Haagensen JAJ, Jelsbak L, Johansen HK, Sternberg C, Hoiby N & Molin S (2008) *In situ* growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J Bacteriol* **190**: 2767–2776.
- Zalar P, de Hoog GS & Gunde-Cimerman N (1999) Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Stud Mycol* **43**: 38–48.
- Zbinden M, Le Bris N, Gaill F & 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.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Target sites of the fluorescent oligonucleotide probes designed on a model of the *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA gene secondary structure in which the D1 and D2 domains (delimited by NL1 and NL4) are enlarged (Inacio *et al.*, 2003).

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

1.2 - Conclusions de cette étude et implications pour l'écologie de *R. exoculata*

Rappel des principaux résultats - Les souches de levures obtenues sont de différente nature : certaines espèces sont ubiquistes et d'autres sont des espèces marines obligatoires. Elles ont été isolées en majorité à partir d'échantillons animaux, particulièrement à partir des échantillons issus des crevettes *R. exoculata*. Les hybridations *in situ* sur l'eau environnante des agrégats de crevettes ont confirmé leur présence sous forme libre et ainsi leur capacité à se développer *in situ* malgré leur faible densité de population.

Le fait que les levures aient été isolées à partir d'échantillons issus d'animaux vivants ou morts suggère une relation saprophyte facultative. Cela renforce l'hypothèse que les champignons ont un rôle important dans la dégradation de la matière organique dans ce type d'environnement. Ils pourraient par exemple intervenir dans la dégradation des exuvies des crustacés amassées à la base des cheminées hydrothermales.

Des souches ont été obtenues notamment à partir de pièces du céphalothorax de *R. exoculata* (branchiostégite et scaphognathite). Mais les hybridations *in situ* avec des sondes universelles fongiques n'ont pas permis de visualiser de champignons dans la cavité céphalothoracique de la crevette. Ceci est probablement lié à leur faible densité de population et au bruit de fond dû à l'auto-fluorescence forte des tissus animaux. Les pièces anatomiques hybridées étant issues de spécimens de *R. exoculata* vivants, les épibiontes étaient très actifs. Il n'est pas exclu que l'épibiose céphalothoracique joue un rôle protecteur pour l'hôte, inhibant la prolifération d'organismes parasites et opportunistes comme pourraient l'être les levures. Cependant, l'activité chitinolytique probable des champignons libère des sucres dans le milieu. Ils peuvent alors être utilisés par les épibiontes de la crevette, contribuant ainsi à l'efficacité de l'association *R. exoculata*-épibiontes. Mais cette étude n'a pas permis de déterminer clairement la nature des interactions entre *R. exoculata* et les champignons.

Expériences complémentaires - Plusieurs questions concernant le rôle des levures dans les écosystèmes hydrothermaux, et les interactions de ces organismes avec la faune inféodée à cet environnement restent ouvertes. Il est donc important d'optimiser l'hybridation *in situ* pour les champignons et d'effectuer de nouvelles hybridations ciblant plus spécifiquement certains phyla fongiques comme les *Ascomycota*, les *Basidiomycota* et les *Chytridiomycota* présents dans les environnements hydrothermaux marins profonds. En parallèle, les conditions de cultures pourraient être diversifiées. La culture sous pression hydrostatique serait une étude intéressante pour mieux caractériser le mode de vie et les rôles des champignons au sein des écosystèmes hydrothermaux.

Les relations possibles entre *R. exoculata* et les levures reposent sur deux hypothèses : c'est une association mutualiste, donc à bénéfice réciproque, ou une relation dont seul l'un des partenaires, plus probablement les levures, retire un bénéfice. Des essais de cultures en présence de broyat de crevette peuvent alors être réalisés afin de voir l'effet sur la croissance des champignons. Le broyat de *R. exoculata* seule pourrait avoir un effet positif sur leur croissance mais il sera difficile de savoir s'il s'agit d'un effet spécifique à la relation entre l'hôte et ces micro-organismes ou s'il s'agit d'un substrat favorisant leur croissance, les champignons étant souvent saprophytes. Des cultures sur un broyat d'épibiontes seuls pourraient permettre d'interpréter le rôle des épibiontes sur les levures. Si la croissance des champignons est inhibée, c'est qu'il existe une relation antagoniste entre les épibiontes bactériens et les levures, ce qui soutiendrait l'hypothèse de la protection de l'hôte par les épibiontes.

Bilan Perspectives

BILAN-PERSPECTIVES

Les champs hydrothermaux marins profonds sont des écosystèmes complexes aux conditions géochimiques particulières. L'étude de la faune associée représente un incroyable réservoir de connaissances nouvelles tant fondamentales (biodiversité, physiologie en conditions extrêmes, interactions) qu'appliquées (nouvelles molécules, peptides de reconnaissance...). Mis à part les espèces abyssales benthiques et pélagiques évoluant autour des champs hydrothermaux, la faune constituant ces écosystèmes est endémique des sources hydrothermales marines profondes. Les connaissances relativement restreintes sur les écosystèmes hydrothermaux marins profonds, en comparaison de celles portant sur les écosystèmes terrestres en général, a pour cause directe la difficulté d'accès à ces environnements. De fait, ils n'ont été découverts que tardivement, en 1977, dans l'histoire des sciences, et la collecte des échantillons reste encore complexe. A ce jour, l'étude de ces écosystèmes repose encore principalement sur l'appréhension globale des phénomènes géochimiques, l'écologie des communautés animales et microbiennes et la description des nouvelles espèces animales et microbiennes. Seuls certains modèles symbiotiques font l'objet d'analyses poussées (biochimie, génomique), tel que *Riftia pachyptila*, *Alvinella pompejana* et *Bathymodiolus azoricus* afin de comprendre les relations unissant les partenaires de ces associations mutualistes et l'efficacité de l'interaction durable entre ceux-ci.

1 - Principaux résultats de mon travail pour l'étude de l'épibiose intestinale de *Rimicaris exoculata*

1.1 - Les faits marquants

La crevette *R. exoculata* est un autre modèle symbiotique des écosystèmes hydrothermaux. Mais il existe encore peu de données sur l'écologie de ce crustacé, principalement du fait des limitations technologiques permettant de mener des approches physiologiques *in vivo*. Mon travail a révélé la présence d'une communauté microbienne complexe autochtone associée à son tractus digestif. Le nombre de phyla caractérisant cette communauté reste limité par rapport à la diversité microbienne environnementale, ce qui confirme les premiers résultats (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003). Une part de cette population microbienne est constituée de micro-organismes allochtones,

probablement ingérés avec les particules de cheminées hydrothermales et l'eau, comme les Archaea. La seconde partie correspond aux épibiontes résidents. Elle est principalement composée de quatre groupes phylogénétiques : les *Deferribacteres*, les *Mollicutes*, les *Epsilonproteobacteria* et les *Gammaproteobacteria* (Chapitre I, article 1). La diversité des phyla présents est similaire, quels que soient l'individu et le site d'origine de l'hôte ce qui suggère une forte co-évolution entre l'hôte et ses symbiontes. Cependant, l'étude fine de la distribution des haplotypes au sein des phylotypes affiliés aux *Deferribacteres* et aux *Mollicutes* (clusters A et B, chapitre II) semble indiquer une histoire évolutive différente pour le site Rainbow (distribution dispersée des haplotypes dans le réseau représentant les relations évolutives) par rapport aux sites Logatchev et Ashadzé (distribution rassemblée, en étoile ou « star-like cluster », des haplotypes dans le réseau représentant les relations évolutives). Ceci laisse supposer une colonisation plus récente sur ces deux sites ou un phénomène de « bottle-neck » récent (Chapitre II). Cette diversité semble peu liée au stade de mue et à l'état de nutrition de l'hôte. Les analyses, tant à partir des ADN (tous micro-organismes) que des ARN (micro-organismes vivants actifs) semblent indiquer que la population la plus active est affiliée aux *Deferribacteres* et présente toujours un unique phylotype. Ainsi, même après un jeûne long de 72 heures pour lequel une baisse importante des clones affiliés à ce phylum est constatée d'après les analyses ADN, les analyses ARN montrent que les représentants de ce phylum sont toujours fortement actifs. D'autre part, les travaux (Chapitre III) montrent une absence de réplication de l'ADN (pas d'incorporation de la BrdU) et de division cellulaire (microscopie) confirmant une colonisation permanente des épibiontes filamenteux insérés entre les microvillosités intestinales. L'hôte contrôle donc probablement la division bactérienne et sa croissance, ce qui implique des mécanismes de communication éprouvés. L'étude préliminaire de spécimens juvéniles en microscopie à transmission ne met pas en évidence de filaments bactériens. La présence de nombreux composés chimiques réducteurs (comme les minéraux des particules de cheminées hydrothermales) dans le bol alimentaire et l'activité probable de ferro-réduction des *Deferribacteres* maintiendraient un environnement anaérobie à l'intérieur de l'intestin. L'élimination de ces minéraux avec les fèces et la mise en place d'un état de jeûne de l'hôte (volontaire ou non, selon qu'il est lié au stade de mue ou à une carence nutritive) provoquerait un changement drastique des conditions géochimiques pour la communauté microbienne, comme la mise en place d'une aérobose, au moins partielle, dans la lumière intestinale. Cette variation pourrait expliquer en partie la présence de *Gammaproteobacteria* proches de phyla aérobies dans le tractus digestif des spécimens soumis aux expérimentations de jeûnes longs. En parallèle, les observations microscopiques montrent des épibiontes filamenteux étroitement associés à l'épithélium intestinal. Ces épibiontes ont été affiliés aux *Epsilonproteobacteria* par hybridations *in situ*. Ils font partie de la communauté résidente. En effet, ils sont présents chez tous les individus, quel que soit leur site d'origine, leur stade dans le cycle de

mue et même chez les spécimens soumis à un jeûne de plusieurs jours et dont le tube digestif est complètement exempt de bol alimentaire. Toutefois, aucune division cellulaire des épibiontes filamenteux n'a jamais été observée en microscopie électronique.

1.2 - Nouvelles hypothèses

Mes résultats suggèrent des interactions entre les différents groupes microbiens, voire une interdépendance de certaines populations épibiontes. Ainsi, par exemple, les épibiontes ferro-réducteurs maintiendraient l'anaérobiose générale dans le tractus digestif de l'hôte. L'activité et la présence des ferro-réducteurs sont probablement liées à l'activité de ferro-oxydation des épibiontes de la cavité céphalothoracique. Mes résultats suggèrent aussi un contrôle du développement des épibiontes filamenteux du mésentéron. En effet, leur morphologie et les hybridations *in situ* montrent que cette population est active mais ne se divise pas. D'autre part, ces micro-organismes filamenteux sont retrouvés exclusivement entre les microvillosités intestinales et n'envahissent pas l'hôte. Cela suggère un contrôle de la division cellulaire microbienne de la part de l'hôte tout en laissant l'infestation se mettre en place et se développer. L'interaction durable entre l'hôte et les épibiontes associés au tractus digestif semble être une association mutualiste dont le caractère obligatoire (ou non) n'est pas encore déterminé. Cependant, le fait que ces épibiontes soient omniprésents, quels que soient le site et les individus, laisse supposer un caractère obligatoire. Tous les individus étaient sains, de même que les tissus sous-jacents, indiquant que ces micro-organismes ne sont sans doute pas pathogènes. Il est possible que les épibiontes associés au tractus digestif de *R. exoculata* jouent un rôle nutritif (synthèse de molécules organiques par les chimioautotrophes) et/ou détoxifiant (fixation des métaux lourds et composés chimiques toxiques via les métabolismes chimiotrophes) pour l'hôte. Le fait que les épibiontes filamenteux s'établissent au niveau de l'épithélium du mésentéron entre les microvillosités, peut suggérer également un rôle protecteur quant aux invasions de pathogènes, ceci par simple compétition avec ces populations ou bien en produisant des substances inhibitrices. De fait, l'hôte a donc tout intérêt à favoriser leur installation tout en la contrôlant. Ces observations semblent donc indiquer une communication très efficace entre l'hôte et ses symbiontes, probablement via son système immunitaire. L'absence de différenciation des épibiontes en fonction des sites de collecte, comme cela est le cas pour l'hôte, laisse supposer une interaction de longue date et une forte co-évolution.

1.3 - Position de *R. exoculata* dans son contexte biogéochimique

Les connaissances actuelles sur *R. exoculata*, les micro-organismes associés, les micro-organismes libres et son environnement géochimique permettent de reconstruire une partie

essentielle du réseau d'interactions constituant « l'écosystème *R. exoculata* ». D'un point de vue géochimique, les principaux métabolismes impliqués dans ce réseau seraient l'oxydation aérobie ou microaérophile des sulfures, du méthane et des composés méthylés, du fer, ainsi que l'hydrogéntrophie et l'oxydation anaérobie du méthane (Fig.35).

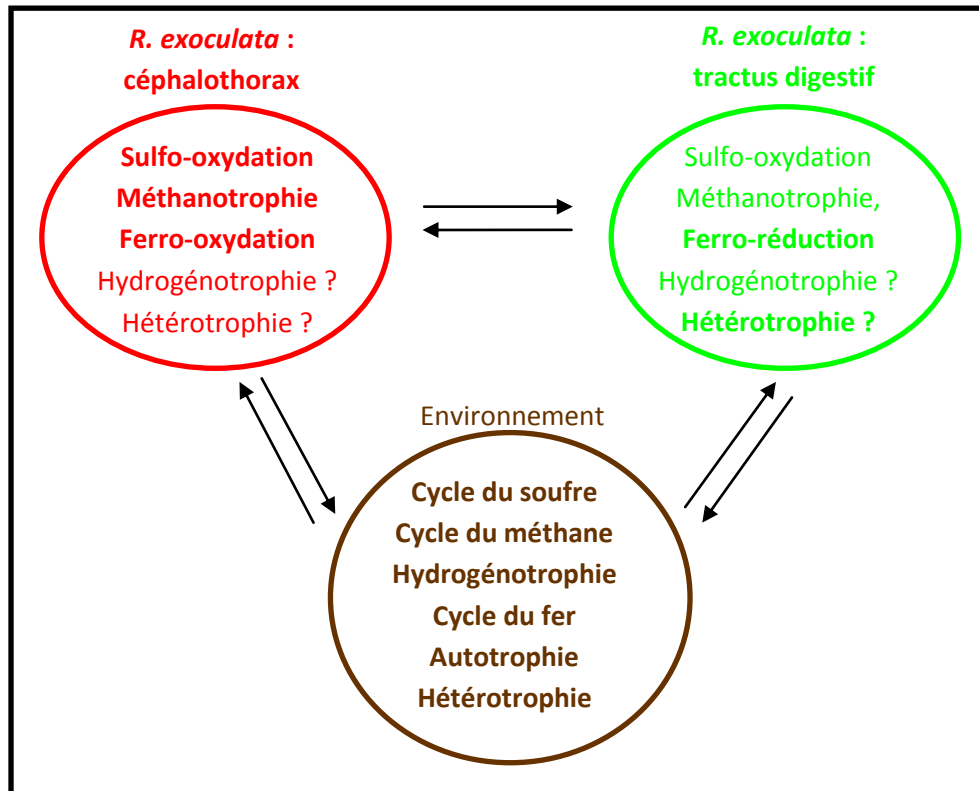


Fig.35 – Représentation schématique des métabolismes impliqués dans « l'écosystème *R. exoculata* ».

Les métabolismes de ce réseau sont représentés par de nombreux groupes microbiens, dont certains sont dépendants des conditions géochimiques comme certains groupes d'*Archaea* associées au tractus digestif de *R. exoculata* (par exemple les *Methanococcales*, Durand et al., 2010) (Fig.36). Le constat le plus évident dans l'analyse de la diversité microbienne est la diminution du nombre de groupes phylogénétiques inféodés à l'hôte par rapport à la diversité environnementale. Ceci est probablement dû à la sélection de groupes spécifiques impliqués dans l'épibiose, faisant de ce partenariat mutualiste une association très efficace en terme d'adaptation à l'environnement (multi-métabolismes).

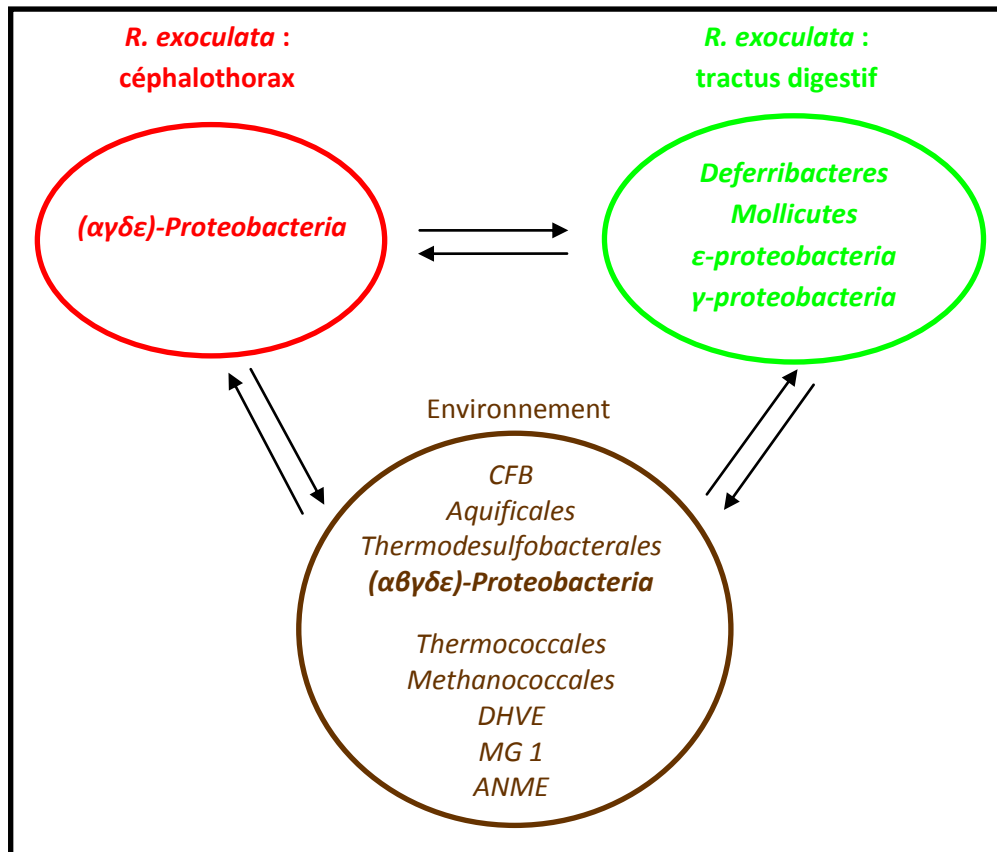


Fig.36 – Représentation schématique des groupes microbiens les plus représentés dans « l'écosystème *R. exoculata* ».

La sélection de groupes microbiens spécifiques pourrait être indirectement liée à l'hôte dans le cas où seuls les micro-organismes « adaptés » aux conditions de vie en épibiose pourraient coloniser la crevette. Mais elle pourrait également se faire directement par l'hôte qui sélectionnerait les micro-organismes en fonction du potentiel bénéfique que représente leur métabolisme. Ainsi, le rôle détoxifiant de l'épibiose serait lié à l'activité des micro-organismes, ce qui rappelle le processus naturel de biolixiviation utilisé (ou exploité) par l'Homme dans le traitement des déchets miniers, riches en métaux.

2 - *Rimicaris exoculata* : un modèle qui a de l'avenir...

2.1 - Perspectives générales

Le bilan de ma thèse offre de nombreuses possibilités quant aux perspectives d'étude du modèle biologique *R. exoculata*. Pour commencer, il faut insister sur le fait que cette étude est un travail pluridisciplinaire impliquant des compétences en microbiologie, biologie et physiologie animale, géochimie et géologie. Il est donc nécessaire de poursuivre les interactions durables

professionnelles en conservant et en élargissant les collaborations déjà existantes pour avancer dans cette étude. Le but est de décrire et de comprendre les interactions entre la crevette et les micro-organismes associés et l'influence de l'environnement (géochimie, physique et micro-organismes libres) sur ces relations.

Une des hypothèses est que la présence des agrégats de crevettes est conditionnée par la présence de communautés microbiennes définies. Le travail pourrait donc s'orienter selon deux axes principaux : les déterminants impliqués dans l'épibiose de l'hôte, mais aussi les facteurs jouant sur la diversité microbienne comprenant les interactions des micro-organismes avec l'écosystème hydrothermal. En parallèle, ce modèle devrait être comparé avec d'autres crustacés tels que des crevettes littorales, d'autres espèces hydrothermales (*Chorocaris chacei*, *Mirocaris fortunata*, *Alvinocaris markensis*) et sa « soeur » vivant sur les sites hydrothermaux de la ride centrale de l'océan Indien, *Rimicaris karei*. En effet l'étude menée sur un autre crustacé décapode, l'amphipode hydrothermal *Ventiella sulfuris*, vivant sur la ride est-Pacifique (Chapitre I, article 2) indique que les épibioses digestives sont répandues dans cet embranchement et donc sans doute anciennes d'un point de vue évolutif ou issues d'une convergence évolutive.

2.2 - Etude des relations hôte-symbiontes

Actuellement, il reste certains points hypothétiques dans l'étude des relations entre *R. exoculata* et ses épibiontes. Dans un premier temps il serait intéressant de poursuivre les études descriptives sur le tractus digestif complet afin de localiser tous les épibiontes. Les *Deferribacteres* semblent être de petits bâtonnets évoluant seuls ou en agrégats dans le bol alimentaire et le long de la paroi stomacale. Les *Epsilonproteobacteria* sont, pour partie, les filaments localisés entre les microvillosités, et pour partie des bâtonnets libres dans la lumière intestinale. Par contre à ce jour, nous n'avons aucune hybridation claire avec les *Mollicutes* mis en évidence par l'approche moléculaire. Il faudra donc poursuivre le développement de nouvelles sondes pour l'hybridation *in situ* et optimiser les conditions d'hybridation principalement sur ce groupe phylogénétique.

Ensuite, les lacunes concernent l'acquisition et la transmission des symbiontes et les rôles de cette communauté microbienne.

Concernant à la fois l'acquisition et la transmission des épibiontes, il faudrait étudier par diverses approches, tous les stades de développement de l'hôte, de l'œuf aux individus adultes, en passant par toutes les métamorphoses des stades larvaires et juvéniles. La microscopie (photonique et électronique) serait utilisée pour observer la mise en place du tractus digestif au cours du développement. Cela serait complété par des hybridations *in situ* en fluorescence qui faciliteraient la visualisation d'une éventuelle colonisation microbienne de l'hôte. En parallèle, des méthodes

d'empreinte génétique permettraient de faire un suivi des populations microbiennes associées au cours du cycle de développement de l'hôte. Ces données, croisées avec les résultats des hybridations *in situ*, permettraient d'affilier les micro-organismes localisés sur les individus. Ces travaux nécessitent donc en premier lieu de trouver les premiers stades d'évolution entre l'œuf et le juvénile. Un effort de collecte d'échantillons d'eau de mer à différentes profondeurs et autour des sources est donc nécessaire au cours des futures campagnes océanographiques

Pour ce qui est du mode de transmission uniquement, deux approches faisant appel aux mêmes techniques (microscopie et biologie moléculaire) peuvent être mise en œuvre. Pour déterminer s'il s'agit d'une transmission verticale, l'étude détaillée de certains organes ou tissus (en particulier les gonades) des individus adultes serait intéressante. Elle peut être couplée à une analyse moléculaire en comparant la diversité microbienne associée aux femelles gravides avec celle associée aux œufs et aux larves du même spécimen. S'il s'agit d'une transmission horizontale, il faudrait tenter de déterminer si la transmission se fait entre individus (par trophallaxie ou par ingestion des mues des congénères par exemple) ou si la transmission est environnementale. Dans ce dernier cas, les empreintes génétiques de la diversité des épibiontes devraient recouper celles des micro-organismes libres de l'environnement.

Suite à nos travaux, les approches en génétique des populations sont aussi à compléter. Les premiers résultats semblent indiquer que les épibiontes digestifs sont non différenciés entre les sites, contrairement à ce qui est décrit pour les épibiontes de la cavité céphalothoracique (Petersen et al., 2010). De même, l'hôte est génétiquement très stable le long de la ride médio-Atlantique (Teixeira et al., in prep). Ces résultats iraient plutôt dans le sens d'une transmission verticale pour les épibiontes digestifs, ce qui reste à démontrer comme précédemment indiqué. De plus, le fait que ce modèle ne se retrouve que sur la MAR est aussi une énigme qu'il s'agira de résoudre. En effet, du site Rainbow (36° Nord) au site MAR sud (4° Sud) *R. exoculata* est retrouvée avec ses épibiontes. Sur le point triple de l'océan Indien *Rimicaris karei* est décrite mais pas ses symbiontes. *Rimicaris* sp. n'est par contre décrite sur aucun site du Pacifique. Les différents océans communiquant, il serait intéressant de faire des campagnes d'exploration le long des rides medio océaniques afin de rechercher les limites d'expansion de ce modèle biologique complexe (*i.e.* avec ses épibiontes) et de tenter de les comprendre (limites physiques, chimiques, début d'expansion...).

L'étude de l'acquisition des symbiontes comporte également l'étude des mécanismes de reconnaissance entre l'hôte et les épibiontes. Cela pourrait s'inscrire dans la recherche de gènes dans la communauté d'épibiontes impliqués dans des systèmes connus participant à la colonisation microbienne tels que les SST3 ou les PGRP. L'acquisition des épibiontes, tout comme leur simple présence, implique l'existence d'un certain contrôle de l'hôte sur la colonisation microbienne mais aussi un contrôle de la croissance microbienne au sein des épibiontes eux-mêmes et envers les

populations opportunistes. La recherche de molécules bioactives impliquées dans ces différents contrôles, telles que des peptides antimicrobiens, pourrait ainsi représenter un volet supplémentaire dans l'étude du modèle *R. exoculata*. Cette association mutualiste présente un important potentiel dans la découverte de nouvelles molécules à application thérapeutique ou cosmétique par exemple.

La seconde zone d'ombre de cette association mutualiste est le rôle des épibiontes. Par des techniques classiques de biologie moléculaire, il est toujours possible de détecter la présence de certains gènes codant des protéines, voire leur expression (RT-PCR), ayant une fonction clé dans certains métabolismes. Mais cette approche permet de ne mettre en évidence que des gènes connus. Une approche en métagénomique permettrait d'identifier, entre autres, les métabolismes mis en jeu dans cette association.

Après l'analyse des résultats de marquage isotopique, il serait également judicieux de réaliser de nouvelles expérimentations *in vivo* en aquarium pressurisé en fonction de ce qui aura été mis en évidence afin d'aller plus loin dans la compréhension des relations de l'hôte avec les épibiontes. Il faudra donc pour cela mettre en œuvre une nouvelle campagne océanographique. Jusqu'à présent, les expériences *in vivo* ont été effectuées sur des spécimens provenant des sites TAG et Rainbow uniquement. Cette nouvelle campagne pourrait être l'occasion de collecter des animaux sur le site Snake Pit ayant été étudié pour la dernière fois il y a une vingtaine d'années ce qui permettrait de réaliser une étude continue de *R. exoculata* le long de la ride médio-Atlantique. Ce serait également l'occasion de programmer une nouvelle exploration du site Ashadzé, sur lequel très peu d'individus avaient été observés et collectés. Contrairement aux autres sites colonisés par l'espèce, seules quelques *R. exoculata* éparses y vivaient, elles ne formaient pas d'agrégats denses.

La culture de micro-organismes est une approche complémentaire pour comprendre cette association. Dans le but de cibler plusieurs métabolismes, différents milieux de culture avaient été inoculés et sont actuellement en cours d'exploitation au laboratoire. Mais il est difficile d'obtenir des cultures positives à partir des tractus digestifs des crevettes. C'est un problème récurrent dans l'étude des symbioses qui nécessitent des conditions de culture très particulières et aux paramètres bien souvent inconnus. L'utilisation de techniques de cultures innovantes pourrait pallier ce problème. Par exemple, la croissance sur gradients opposés de sources d'énergie en milieu semi-solide permettrait de travailler dans des conditions plus souples en ce qui concerne la disponibilité et la concentration des substrats. Si des épibiontes sont hétérotrophes ou auxotrophes pour de nombreux composés chimiques dont la nature est inconnue, il faut utiliser un substrat le plus complet et le plus proche possible des conditions *in situ*. Ce substrat pourrait être un broyat filtré de *R. exoculata*. De même, pour reproduire certains des paramètres *in situ*, des cultures sous pression peuvent être réalisées.

2.3 - Etude des relations hôte-symbiotiques avec l'environnement

Afin de resituer l'association entre *R. exoculata* et les épibiontes dans son contexte géochimique, les interactions entre cette association et l'environnement doivent être prises en compte. L'approche culturale est déterminante dans l'étude des interactions des micro-organismes avec l'environnement. Mais elle peut être complétée par d'autres techniques. Par exemple, d'après la géochimie du site Rainbow, site mantellique riche en fer, les métabolismes du fer (basés sur la ferro-oxydation et la ferro-réduction) sont certainement très présents (Schmidt et al., 2008). Or, d'après les connaissances actuelles sur *R. exoculata*, il apparaît que ses épibiontes seraient impliqués dans les métabolismes du fer (observations microscopiques, cultures, Zbinden et al, 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a, 2008b ; Durand et al., 2010). De plus, l'influence biotique sur le cycle du fer en milieu hydrothermal marin profond est une donnée inconnue dans l'étude des cycles biogéochimiques. Elle représente un grand intérêt pour les géologues dans l'étude des sites hydrothermaux mantelliques, en particulier afin de mesurer l'impact sur le recyclage du fer *in situ*. L'impact physique des agrégats de crevette sur la morphologie des cheminées avait déjà été constaté lors de précédents travaux (Segonzac et al., 1993). L'utilisation d'échantillons bruts mais surtout de micro-organismes ferro-oxydants et ferro-réducteurs en culture permettrait d'analyser le fractionnement du fer en milieux hydrothermal et au sein de la communauté épibionte de la crevette. Les techniques utilisées seraient la diffraction X et l'ICP-MS (spectrométrie de masse couplée à plasma inductif), faisant appel au domaine des géosciences.

Enfin, la métagénomique, précédemment citée comme méthode d'étude des métabolismes mis en jeu dans la symbiose, peut également être utilisée ici dans l'étude des interactions des épibiontes et des micro-organismes libres avec l'environnement.

3 - Conclusion

Les associations symbiotiques représentent un réservoir de nouvelles connaissances et applications dans différents domaines de la recherche appliquée (biotechnologies, pharmacologie, cosmétologie...) et fondamentale (adaptation, évolution, origines du Vivant). Les écosystèmes hydrothermaux sont souvent considérés comme un modèle de l'écosystème primordial terrestre. L'intérêt d'étudier le modèle *R. exoculata* n'est donc plus à démontrer. De plus, les interactions durables sont un des phénomènes biologiques clé dans l'étude du Vivant. En effet, elles sont omniprésentes dans la biosphère et représentent souvent une cause charnière dans la dynamique des populations. Les interactions durables entre individus peuvent aussi bien être responsables de la

mortalité de certaines espèces dans le cas des interactions hôte-pathogène par exemple, que de la colonisation de nouveaux environnements dans le cas du mutualisme par exemple. Les interactions durables sont bien souvent un paramètre important, jouant un rôle de facteur favorable et favorisant dans l'adaptation des Etres Vivants aux changements environnementaux. La description de la biodiversité ne doit donc pas s'arrêter à la simple description espèce par espèce au sein d'un environnement donné mais elle doit s'inscrire dans la compréhension du fonctionnement global d'un écosystème dont la biocénose et le biotope sont interdépendants (**Fig.1**).

BIBLIOGRAPHIE

A

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.

Anselme, C., Vallier, A., Balmand, S., Fauvarque, M.-O. and Heddi, A. (2006) Host *PGRP* gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(10): 6766-6772.

Arp, A.J., Childress, J.J. and Vetter, R.D. (1987) Hydrogen sulfide binds to hemoglobin, reversibly and independently of oxygen. *J. Exp. Biol.* **128**: 139-158.

Atlas, R.M., Busdosh, M., Krichevsky, E.J. and Kaneko, T. (1982) Bacterial populations associated with the Arctic amphipod *Boeckosimus affinis*. *Can. J. Microbiol.* **28**(1): 92-99.

B

Barnard, J.L., and Ingram, C. (1990) Lysianassoid Amphipoda (Crustacea) from deep-sea hydrothermal vents. *Smithsonian Contrib. Zool.* **499**: 1-80.

Barnes, I., Rapp, J.R., O'Neil, J.R., Sheppard, R.A. and Gude, A.J. (1972) Metamorphic assemblages and the direction of flow of metamorphic fluids in four instances of serpentinization. *Contrib. Mineral. Petrol.* **35**:263-276.

Bassler, B.L. and Losick, R. (2006) Bacterially Speaking. *Cell* **125**:237-246.

Behrens, S., Lösekann, T., Pett-Ridge, J., Weber, P.K., Ng, W.-O., Stevenson, B.S., Hutcheon, I.D., Relman, D.A. and Spormann, A.M. (2008) Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridisation (EL-FISH) and NanoSIMS. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(10): 3143-3150.

Bellan-Santini, D. (1998) Crustacés Amphipodes des sources hydrothermales: bilan des connaissances. *Cah. Biol. Mar.* **39**:143-152.

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.

Bergmans, L., Moisiadis, P., Van Meerbeek, B., Quirynen, M. and Lambrechts, P. (2005) Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int. Endod. J.* **38**: 775-788.

Brautaset, T., Jakobsen, O. M., Flickinger, M. C., Valla, S. and Ellingsen, T. E. (2004) Plasmid-dependent methylothrophy in thermotolerant *Bacillus methanolicus*. *J. Bacteriol.* **186**:1229-1238.

Brissac, T., Gros, O. and Merçot, H. (2009) Lack of endosymbiont release by two *Lucinidae* (*Bivalva*) of the genus *Codakia*: consequences for symbiotic relationships. *FEMS Microbiol. Ecol.* **67**:261-267.

Brownlie, J.C. and Johnson, K.N. (2009) Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* **17**(8): 348-354.

Burgaud, G., Le Calvez, T., Arzur, D., Vandenkoornhuyse, P. and Barbier, G. (2009) Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. *Environ. Microbiol.* **11**: 1588-1600.

Byrne, N., Lesongeur, F., Bienvenu, N., Geslin, C., Alain, K., Prieur, D. and Gofroy, A. (2009) Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor. *Extremophiles* **13**(4): 595-608.

C

- Cameron, J. and Quale, S. (2004) Alien of the deep. Buena Vista International, USA.
- Camin, J.H. and Sokal, R.R. (1965) A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evol.* **19**: 311-326.
- Cary, S.C., Shank, T. and Stein, J. (1998) Worms bask in extreme temperatures. *Nature* **391**: 545-546.
- 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.
- Chamberlain, S.C. (2000) Vision in hydrothermal vent shrimp. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **355**: 1151-1154.
- 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.
- Chiel, E., Zchori-Fein, E., Inbar, M., Gottlieb, Y., Adachi-Hagimori, T., Kelly, S.E., Asplen, M.K. and Hunter, M.S. (2009) Almost there: transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS ONE* **4**(3): 1-11.
- Coleman, R.G. (1971) Petrologic and geophysical nature of serpentinites. *Geol. Soc. Am. Bull.* **82**:897-918.
- Combes, C. (1995) Du parasitisme au mutualisme. *Dans Interactions durables: écologie et évolution du parasitisme p.462*. Collection écologie n°26. Masson, Paris, France.
- Coombes, B.K. (2009) Type III secretion systems in symbiotic adaptation of pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* **17**(3): 89-94.
- 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.
- Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., Von Herzen, R.P., Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K. and Van Andel, T.H. (1979) Submarine thermal springs on the Galápagos Rift. *Science* **203**(4385): 1073-1083.

D

- Dale, C., Young, S.A., Haydon, D.T. and Welburn, S.C. (2001) The insect endosymbiont *Sodalis glissinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 1883-1888.
- Dale, C., Plague, G.R., Wang, B., Ochman, H. and Moran, N. (2002) Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**(19): 12397-12402.
- Dale, C. and Moran, A.N. (2006) Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* **126**: 453-465.

Dattagupta, S., Schaperdoth, I., Montanari, A., Mariani S., Kita, N., Valley, J.W. and Macalady, J.L. (2009) A novel symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a freshwater cave amphipod. *The ISME J.* **3**: 935-943.

Davidov, Y. and Jurkevitch, E. (2009) Predation between prokaryotes and the origin of eukaryotes. *BioEssays* **31**: 748-757.

Davidson, S.K. and Stahl, D.A. (2008) Selective recruitment of bacteria during embryogenesis of an earthworm. *The ISME J.* **2**: 510-518.

Davis, J.W. and Sizemore, R.D. (1982) Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinassa sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** : 1092-1097.

Dempsey, A.C. and Kitting, C.L. (1987) Characteristics of bacteria isolated from penaeids shrimp. *Crustaceana* **52**: 90-94.

Dempsey, A.C., Kitting, C.L., Rosson, R.A. (1989) Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana* **56**(3): 266-278.

Desbruyères, D., Chevaldonné, P., Alayse, A.-M., Jollivet, D., Lallier, F.H., Jouin-Toulmond, C., Zal, F., Sarradin, P.-M., Cosson, R., Caprais, J.-C., Arndt, C., O'brien, J., Guezennec, J., Hourdez, S., Riso, R., Gaill, F., Laubier, L. and Toulmond, A. (1998) Biology and ecology of the Pompeii worm (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment : A synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-sea Res. Part 2. Topical studies in oceanography.* **45**(1-3): 383-422.

Douglas, A.E. (1985) Growth and reproduction of *Convoluta roscoffensis* containing different naturally occurring algal symbionts. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **65**: 871-879.

Douglas, A.E. (1998) Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. *Heredity* **81**: 599-603.

Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, A., Pernthaler, A., McKiness, Z. P., DeChaine, E., Cavanaugh, C. M. and Dubilier, N. (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., Sibuet, M., MacGregor, B. J., Kuypers, M. M. M., Fisher, C. R. and Dubilier, N. (2007) Diversity, relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico. *Environ. Microbiol.* **9**:1423-1438.

Durand, L., Zbinden, M., Cueff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E.G., Shillito, B. and Cambon-Bonavita M.-A. (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

Edgcomb, V.P., Kysela, D.T., Teske, A. and de Vera Gomez, A. (2002) Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 7658-7662.

Edwards, K.J., Rogers, D.R., Wirsén, C.O. and McCollom, T.M. (2003) Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic *alpha*- and *gamma*-*Proteobacteria* from the deep sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2906-2913.

Emerson, D. and Merrill Floyd, M. (2005) Enrichment and isolation of iron-oxidizing bacteria at neutral pH. *Methods in Enzymology*, p. 112-123. In J. R. Leadbetter (ed.), *Environmental Microbiology*, Volume 397 ed. Academic Press.

Emerson, D., and Moyer, C. (1997) Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4784-4792.

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

Evertsen, J., Burghardt, I., Johnsen, G. and Wägele, H. (2007) Retention of functional chloroplasts in some sacoglossans from the Indo-Pacific and Mediterranean. *Mar. Biol.* **151**: 2159-2166

F

Federle, M.J. and Bassler, B.L. (2003) Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* **112**:1291-1299.

Feingersh, R. and Béjà, O. (2009) Bias assessments of marine SAR11 biodiversity in environmental fosmid and BAC libraries. *The ISME J.* **3**: 1117-1119.

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.

Forster, G.R. (1953) Peritrophic membranes in the Caridea (Crustacea Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **32**(2): 315-318.

G

Gadanho, M. and Sampaio, J. (2005) Occurrence and diversity of yeasts in the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. *Microb. Ecol.* **50**: 408-417.

Gadd, G.M. (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycolog. Res.* **111**: 3-49.

Galán, J.E. and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**(5418): 1322-1328.

Gebruk, A.V., Galkin, S.V., Vereshchaka, A.L., Moskalev, L.I. and Southward, A.J. (1997) Ecology and biogeography of the hydrothermal vent fauna of the Mid-Atlantic Ridge. *Adv. Mar. Biol.* **32**: 94-144.

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.

Gil-Turnes, S.M. and Fenical, W. (1992) Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. *Biol. Bull.* **182**: 105-108.

Gil-Turnes, S.M., Hay, M.E. and Fenical, W. (1989) Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* **246**: 117-118.

Goebel, W. and Gross, R. (2001) Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends Microbiol.* **9**: 267-273.

Golubovsky, M.D. and Plus, N. (1982) Mutability studies in 2 *Drosophila melanogaster* isogenic stocks, endemic for C picornavirus and virus-free. *Mutat. Res.* **103**: 29-32.

Gorbushina, A.A., Beck, A. and Schulte, A. (2005) Microcolonial rock inhabiting fungi and lichen photobionts: evidence for mutualistic interactions. *Mycol. Res.* **109**(11): 1288-1296.

Gray, N.D., Howarth, R., Pickup, R.W., Gwyn Jones, J. and Head, I.M. (2000) Use of combined microautoradiography and fluorescence in situ hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *Achromatium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(10): 4518-4522.

Guinot, D., Doumenc, D. and Chintiroglou, C.C. (1995) A review of the carrying behaviour in brachyuran crabs, with additional information on the symbioses with sea anemones. *The Raffles Bull. Zool.* **43**(2): 377-416.

Gunzl, H. (1991) The ultrastructure of the posterior gut and caecum in *Alona affinis* (Crustacea, Cladocera). *Zoomorphol.* **110**(3): 139-144.

H

Halary, S., Riou, V., Gaill, F., Boudier, T. and Duperron, S. (2008) 3D FISH for the quantification of methane- and sulphur-oxidizing endosymbionts in bacteriocytes of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *The ISME J.* **2**: 284-292.

Hanson, R. and Hanson, T. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**:439-471.

Harris, J.M., Seiderer, L.J. and Lucas, M.I. (1991) Gut microflora of two saltmarsh detritivore Thalassinid prawns, *Upogebia africana* and *Callinassa kraussi*. *Microb. Ecol.* **21**: 63-82.

Harris, J.M. (1993) The presence, nature and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.* **25**: 195-231.

Henke, J.M. and Bassler, B.L. (200). Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* **14**:648-656.

Hentschel, U. and Steinert, M. (2001) Symbiosis and pathogenesis: common themes, different outcomes. *Trends Microbiol.* **9**: 585.

Hong, S.H., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S. and Epstein, S.S. (2009) Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *The ISME J.* **3**:1365-1373.

Hoyoux, C., Zbinden, M., Samadi, S., Gaill, F. and Compère, P. (2009) Wood-based diet and gut microflora of a galatheid crab associated with Pacific deep-sea wood falls. *Mar. Biol.* **156**: 2421-2439.

Huber, J.A., Morrison, H.G., Huse, S.M., Neal, P.R., Sogin, M.L. and Mark Welch, D.B. (2009) Effect of PCR amplicon size on assessments of clone library microbial diversity and community structure. *Environ. Microbiol.* **11**(5): 1292-1302.

Huq, A., Small, E.B., West, P.A., Huq, I., Rahman, R. and Colwell, R.R. (1983) Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic Crustacea copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 275-283.

Huq, A., Huq, S.A., Grimes, D.J., O'Brien, M., Chu, K.H., Capuzzi, J.M. and Colwell, R.R. (1986) Colonization of the gut of the blue crab *Callinectes sapidus* by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(3): 586-588.

I

Icely, J.D. and Nott, J.A. (1992) Digestion and absorption: digestive system and associated organs. In Harrison, S.W., Humes, A.G. (eds) *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol 10: Decapod crustacea. Wiley-Liss, New York, pp 147-201.

K

Kelley, D.S., Karson, J.A., Blackman, D.K., Früh-Green, G.L., Butterfield, D.A., Lilley, M.D., Olson, E.J., Schrenk, M.O., Roe, K.K., Lebon, G.T., Rivizzigno, P. and the AT3-60 Shipboard Party (2001) An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30° N. *Nature* **412**(12): 145-149.

Kimbell, J.R. and McFall-Ngai, M.J. (2003) The squid-vibrio symbioses: from demes to genes. *Integr. Comp. Biol.* **43**: 254-260.

Komaï, T. and Segonzac, M. (2006) *Rimicaris exoculata* Williams & Rona, 1986. In Desbruyères, D, Segonzac, M. and Bright, M.(eds) Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna. Denisia 18, Linz, Austria, p 428.

Komaï, 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.

Kucera, S. and Wolfe, R.S. (1957) A selective enrichment method for *Gallionella ferruginea*. *J. Bacteriol.* **57**: 344-349.

L

Lau, W.W.Y., Jumars, P.A. and Armbust, E.V. (2002) Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callianassa*) *californiensis* (Decapoda: Thalassinidae). *Microb. Ecol.* **43**: 455-466.

Le Bris, N., Zbinden, M. and Gaill, F. (2005) Processes controlling the physico-chemical micro-environment associated with Pompeii worms. *Deep-sea Res. Part 1. Oceanographic research papers.* **52**(6): 1071-1083.

Lecointre, G. and Le Guyader, H. (2001) Classification phylogénétique du Vivant. Belin, Paris, France.

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

Lopez-Garcia, P., Vereshchaka, A. and Moreira, D. (2007) Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid seawater interface in Lost City hydrothermal field. *Environ. Microbiol.* **9**: 546-554.

Lutz, R.A., Jablonski, D., Rhoads, D.C. and Turner, R.D. (1980) Larval dispersal of a deep-sea hydrothermal vent bivalve from the Galápagos Rift. *Mar. Biol.* **57**: 127-133.

Lutz, R.A., Jablonski, D. and Turner, R.D. (1984) Larval development and dispersal at deep-sea hydrothermal vents. *Science* **226**(4681): 1451-1454.

M

Margulis, L., Dolan, M.F. and Guerrero, R. (2000) The chimeric eukaryote: origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**(13): 6954-6959.

Marsh, A.G., Mullineaux, L.S., Young, C.M. and Manahan, D.T. (2001) Larval dispersal potential of the tubeworm *Riftia pachyptila* at deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **411**: 77-80.

Martin, J.W. and Christiansen, J.C. (1995) A new species of the shrimp genus *Chorocaris* Martin & Hessler, 1990 (Crustacea: Decapoda: Bresiliidae) from hydrothermal vent fields along Mid-Atlantic Ridge. *Proc. Biol. Soc. Washington* **108**:220-227.

Martin, J.W., Signorovitch, J. and Patel, H. (1997) A new species of *Rimicaris* (Crustacea: Decapoda: Bresiliidae) from the Snake Pit hydrothermal vent field on the Mid-Atlantic Ridge. *Proceed. Biologic. Soc. Washington* **110**(3): 399-411.

Mattson, R.A. (1988) Occurrence and abundance of eccrinaceous fungi (Trichomycetes) in Brachyuran crabs from Tampa Bay, Florida. *J. Crust. Biol.* **8**(1): 20-30.

Milne-Edwards, H. (1840) Histoire naturelle des crustacés, comprenant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux. Librairie encyclopédique de Roret, Paris, France.

Moran, N.A. (2006) Symbiosis. *Curr. Biol.* **16**(20): 866-871.

Moran, N.A., Tran, P. and Gerardo, N.M. (2005a) Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum *Bacteroidetes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(12): 8802-8810.

Moran, N.A., Degnan, P.H., Santos, S.R., Dunbar, H.E. and Ochman, H. (2005b) The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**(47): 16919-16926.

Moran, N.A., McCutcheon, J.P. and Nakabachi, A. (2008) Genomic and evolution of heritable bacterial symbionts. *Ann. Rev. Genet.* **42**: 165-190.

Musgrove, R.J. (1988) Digestive ability of the freshwater crayfish *Paranephrops zealandicus* (White) (parastacidae) and the role of microbial enzymes. *Freshwater Biol.* **20**: 305-314.

N

Nalepa, C.A., Maekawa, K., Shimada, K., Saito, Y., Arellano, C. and Matsumoto, T. (2008) Altricial development in subsocial wood-feeding cockroaches. *Zoologic. Sci.* **25**: 1190-1198.

Nuckley, D.J., Jinks, R.N., Herzog, E.D., Battelle, B.-A., Kass, L., Renninger, G.H. and Chamberlain, S.C. (1996) Retinal anatomy of a new species of Bresiliid shrimp from a hydrothermal vent field of the Mid-Atlantic Ridge. *Biol. Bull.* **190**: 98-110.

Nussbaumer, A.D., Fisher, C.R. and Bright, M. (2006) Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* **441**(18): 345-348.

O

Ohwada, K., Tabor, P.S. and Colwell, R.R. (1980) Species composition and barotolerance of gut microflora of deep-sea benthic macrofauna collected at various depths in the Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 746-755.

Olivier, K.M., (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 1803-1807.

O'Neill, P.J., Jinks, R.N., Herzog, E.D., Battelle, B.-A., Kass, L., Renninger, G.H. and Chamberlain, S.C. (1995) The morphology of the dorsal eye of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Visual Neurosci.* **12**(5): 861-875.

Orton, J.H. (1920) Mode of feeding and sex-phenomena in the pea-crab. *Nature* **106**: 533-534.

Oxley, A.P., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D. (2002) Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J. Appl. Microbiol.* **93**(2): 214-223.

P

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

Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. (2002) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(6): 3094-3101.

Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. (2004) Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(9): 5426-5433.

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.* In press.

Pinn, E.H., Nickell, L.A., Rogerson, A. and Atkinson, R.J.A. (1999) Comparison of gut morphology and gut microflora of seven species of mud shrimp (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea). *Mar. Biol.* **133**(1): 103-114.

Pitts, G.Y. and Cowley, G.T. (1974) Mycoflora of the habitat and midgut of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Mycologia* **66**: 669-675.

Plouviez, S., Shank, T.M., Faure, B., Daguin-Thiebaut, C., Viard, F., Lallier, F.H. and Jollivet, D. (2009) Comparative phylogeography among hydrothermal vent species along the East Pacific Rise reveals vicariant processes and population expansion in the South. *Mol. Ecol.* **18**(18): 3903-3917.

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.W., Sargent, J.R., Fallick, A.E., Allen, C., Bell, M.V., and Dixon, D.R. (2000) $\delta^{13}\text{C}$ values of lipids from phototrophic zone microplankton and bathypelagic shrimps at the Azores sector of the Mid-Atlantic Ridge. *Deep-sea Res. I: Oceanographic Research Papers* **47**:121-136.

Postec, A., Lesongeur, F., Pignet, P., Ollivier, B., Querellou, J. and Godfroy, A. (2007) Continuous enrichment cultures : insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles* **11**(6):747-757.

Powell, M. A. and Somero, G. N. (1986) Adaptations to sulfide by hydrothermal vent animals: sites and mechanisms of detoxification and metabolism. *Biol. Bull.* **171**:274-290.

Q

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

R

Rajilić-Stojanović, M., Smidt, H. and de Vos, W.M. (2007) Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ. Microbiol.* **9**(9):2125-2384.

Rieley, G., Van Dover, C.L.V., Hedrick, D.B., and Eglinton, G. (1999) Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*? a combined lipid abundance/stable isotope approach. *Mar. Biol.* **133**:495-499.

Ronquist, F and Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.

Roussel, E.G., Sauvadet, A.-L., Chaduteau, C., Fouquet, Y., Charlou, J.-L., Prieur, D. and Cambon-Bonavita, M.-A. (2009) Archaeal communities associated with shallow to deep seafloor sediments of the New Caledonia Basin. *Environ. Microbiol.* **11**(9): 2446-2462.

Rumpho, M.E., Summer, E.J., Manhart, J.R. (2000) Solar-powered sea slugs. Mollusc/algal chloroplast symbiosis. *Plant Physiol.* **123**: 29–38.

Rumpho, M.E., Worful, J.M., Lee, J., Kannan, K., Tyler, M.S., Bhattacharya, D., Moustafa, A. and Manhart, J.R. (2008) Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene *psbO* to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**(46): 17867-17871.

S

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

Salerno, J.L., Macko, S.A., Hallam, S.J., Bright, M., Won, Y.-J., McKiness, Z. and Van Dover, C.L. (2005) Characterization of symbiont populations in life-history stages of mussels from chemosynthetic environments. *Biol. Bull.* **208**: 145-155.

Sanders, W.B. (2006) A feeling for the superorganism: expression of plant form in the lichen thallus. *Botanic. J. Linnean Soc.* **150**: 89-99.

Schmitt, S., Weisz, J.B., Lindquist, N. and Hentschel, U. (2007) Vertical transmission of a phylogenetically complex microbial consortium in the viviparous sponge *Ircinia felix*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(7): 2067-2078.

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.

Sciscioli, M., Lepore, E., Gherardi, M. and Liaci, L.S. (1994) Transfer of symbiotic bacteria in the mature oocyte of *Geodia sydonium* (Porifera, Demospongiae): an ultrastructural study. *Cah. Biol. Mar.* **35**: 471-478.

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.

Segonzac, M. (1992). Les peuplements associés à l'hydrothermalisme du site Snake Pit (dorsale médio-Atlantique, 23°N, 3480 m) : contribution et distribution de la mégafaune. *C. R. Acad. Sci. III* **314**:593-600.

Sélosse, M.-A. (2000) La symbiose: structure et fonctions, rôle écologique et évolutif. Vuibert, Paris, France.

Sélosse, M.-A. (2009) L'évolution des génomes endosymbiotiques: de l'avantage d'être petit ? *Biofutur* **299**: 28-32.

Sélosse, M.-A, Albert, B. and Godelle, B. (2001) Reducing the genome size of organelles favours gene transfer to the nucleus *Trends Ecol. Evol.* **16**(3): 135-141.

Shank, T.M., Lutz, R.A. and Vrijenhoek, R.C. (1998) Molecular systematics of shrimp (Decapoda: Bresiliidae) from deep-sea hydrothermal vents, I: Enigmatic "small orange" shrimp from the Mid-Atlantic Ridge are juvenile *Rimicaris exoculata*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **7**(2): 88-96.

Shedden, M. and Van Dover, C.L. (2007) Temporal and spatial variation in the reproductive ecology of the vent-endemic amphipod *Ventiella sulfuris* in the eastern Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **331**:181-194.

Shillito, B., Jollivet, D., Sarradin, P.-M., Rodier, P., Lallier, F., Desbruyeres, D., and Gaill, F. (2001) Temperature resistance of *Hesiolyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker wall. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **216**:141-149.

Shillito, B, Hamel, G, Duchi, C., Cottin, D., Sarrazin, J., Sarradin, P.-M., Ravaux, J. and Gaill, F. (2008) Live capture of megafauna 2300 m depth, using a newly designed pressurized recovery device. *Deep-sea Res. Part 1. Instruments and methods.* **55**: 881-889.

Shiner, E.K., Rumbaugh, K.P. and Williams, S.C. (2005) Interkingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:935-947.

Siva-Jothy, M.T., Moret, Y. and Rolff, J. (2005) Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Adv. Insect Physiol.* **32**: 1-48.

Stein, J.L., Cary, C., Hessler, R.R., Ohta, S., Vetter, R., Childress, J.J. and Felbeck, H. (1988) Chemoautotrophic symbiosis in a hydrothermal vent gastropod. *Biol. Bull.* **174**:373-378.

Stewart, F.J. and Cavanaugh, C.M. (2009) Pyrosequencing analysis of endosymbiont population structure: co-occurrence of divergent symbiont lineages in a single vesicomid host clam. *Environ. Microbiol.* **11**(8): 2136-2147.

Stickle, W.B., Kozloff, E.N., Henk, M.C. (2007) The ciliate *Orchitophrya stellarum* viewed as a facultative parasite of asteriid sea stars. *Cah. Biol. Mar.* **48**(1): 9-16.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *An. Rev. Microbiol.* **56**:187-209.

T

Toh, H., Weiss, B.L., Perkin, S.A., Yamashita, A., Oshima, K., Hattori, M. and Aksoy, S. (2006) Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Res.* **16**: 149-156.

Trench, R.K. (1975) Of 'leaves that crawl': functional chloroplasts in animal cells. In DH Jennings, ed, Symbiosis Symposium, Vol 29. Society for Experimental Biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 229–265.

U

Ueda, R., Sugita, H. and Degushi, Y. (1988) Numerical taxonomy of vibrios isolated from coastal Crustacea of Japan. *Bull. Coll. Agric. Vet. Med. Nihon Univ.* **8**(45): 227-235.

V

- 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.
- Van Dover, C.L., Reynolds, G.T., Chave, A.D. and Tyson, J.A. (1996) Light at deep-sea hydrothermal vents. *Geophys. Res. Lett.* **23**(16): 2049-2052.
- Verberkmoes, N.C., Russell, A.L., Shah, M., Godzik, A., Rosenquist, M., Halfvarson, J., Lefsrud, M.G., Apajalahti, J., Tysk, C., Hettich, R.L. et al. (2008) Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *The ISME J.* **3**: 179-189.
- Vereshchaka, A.L. (1996) A new genus and species of caridean shrimp (Crustacea: Decapoda: Alvinocarididae) from North Atlantic hydrothermal vents. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **76**: 951-961.
- Vinogradov, N. (1993) Amphipoda (Crustacea) from thermal vents in the Eastern Pacific. *Hydrobiological J.* **29**:77-92.
- Vinogradov, N. (1995) Amphipods from hydrothermal vents and cold seepings on the ocean bottom. *Oceanology* **35**:69-74.
- Vivares, B.M. and Baleux, B. (1984) Parasitism and digestive bacterial flora in decapods (Crustacea). *In: Tumbay, E., Yasarol, S., Ozcel, M.A. (eds) The fourth European multicolloquium of parasitology, Izmir, Turkey pp 202-203.*
- Vogt, G. (1987) Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis. *Aquaculture* **67**: 157-164.
- Vogt, G. (1994) Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreas cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology* **114**: 83-101.
- Vogt, G. (1996) Morphology and physiology of digestive epithelia in Decapods crustaceans. *Eur. J. Physiol.* **431**: 239-240.
- Vogt, G., Stöcker, W., Storch, V. and Zwilling, R. (1989) Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry* **91**: 373-381.
- Vogt, G. and Quintio, E.T. (1994) Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium. *Aquat. Toxicol.* **28**: 223-241.

W

- Wagner-Merner, D.T. (1979) Observations on a trichomycete from *Uca pugilator*. *Mycologia* **71**: 669-671.
- Walsh, D.A., Zaikova, E., Howes, C.G., Song, Y.C., Wright, J.J., Tringe, S.G., Tortell, P.D. and Hallam, S.J. (2009) Metagenome of a versatile chemolithoautotroph from expanding oceanic dead zones. *Science* **326**: 578-582.
- Whittenbury, R., Phillips, K.C. and Wilkinson, J.F. (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**:205-218.
- Whittington, I.D. (1998) Diversity down under: monogeneans in the antipodes Australia with a prediction of monogenean biodiversity worldwide. *Int. J. Parasitol.* **28**: 1481–1493.
- Wilcox, J.L., Dunbar, H.E., Wolfinger, R.D. and Moran, N.A. (2003) Consequences of reductive evolution for gene expression in an obligate endosymbiont. *Mol. Microbiol.* **48**: 1491-1500.
- Williams, O.B. and Rees, H.B.jr. (1952) The bacteriology of Gulf Coast shrimps. III. The internal flora. *Texas J. Sci.* **1**: 55-58.

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.

Wilmot Jr., D.B. and Vetter, R.D. (1990) The bacterial symbiont from the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* is a sulfide specialist. *Mar. Biol.* **106**(2): 273-283.

Z

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

Zachary, A., Parrish, K.K., and Bultman, J.D. (1983) Possible role of marine bacteria in providing the creosote-resistance of *Limnoria tripunctata*. *Mar. Biol.* **75**(1): 1-8.

Zal, F. (1998) Sulphide-binding processes of *Riftia pachyptila* haemoglobins. *Cah. Biol. Mar.* **39**(3-4): 327-328.

Zal, F., Leize, E., Lallier, F.H., Toulmond, A., VanDorsseleer, A. and Childress, J.J. (1998) S-sulfohemoglobin and disulfide exchange: the mechanisms of sulfide binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(15): 8997-9002.

Zbinden, M., and Cambon-Bonavita, M.-A. (2003) Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *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., Gaill F. and Cambon-Bonavita M.-A. (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.

ABSTRACT

Deep-sea hydrothermal vents are key environments for the Life evolution understanding. The absence of light, the hydrostatic pressure, the low level of nutrients and the geochemical and temperature conditions variability observed are very restrictive for the animal settlement. In these ecosystems, the driving energy comes from the microbial chemosynthesis, in contrast to the “photic” marine ecosystems in which the energy comes from the photosynthesis. Symbioses between deep-sea hydrothermal invertebrates and micro-organisms are common. They could be associations such as parasitism, commensalism or mutualism or even obligate symbioses. They could play distinct roles such as trophic roles, detoxification, population control...

The caridean shrimp *Rimicaris exoculata* is an endemic species of the Mid-Atlantic Ridge (MAR) hydrothermal sites. It is the main species of the megafauna of some MAR sites. This crustacean harbors two microbial colonization regions but their roles are still unknown. A dense and structured epibiosis is described on its hypertrophied mouthparts. Preliminary works showed the presence of microbial communities in the digestive tract. The aim of this study was to identify the micro-organisms associated with the digestive tract of the shrimp and to understand the relationships with the host using various approaches.

This work showed that there were distinct microbial communities among which a part would be resident and specific to *R. exoculata*. This community is composed of *Deferribacteres*, *Mollicutes* and *Epsilonproteobacteria*. The microscopic approaches revealed the dominance of a single filamentous morphotype closely associated with the gut epithelium. Its settlement and growth seemed to be managed by the host. The molecular approaches let us infer hypotheses regarding the epibiosis: (1) the Rainbow site epibionts harbored a phylogenetic particularity suggesting an ancient evolutionary history whereas the Logatchev and Ashadzé seemed to have been colonized more recently by the association host-epibionts, (2) the epibionts, not retrieved in the surrounding environment and clustering in a monophyletic group along the MAR, could be vertically-transmitted, and (3) the association between *R. exoculata* and the epibionts could be mutualistic and obligate.

So, this research study gave the bases to understand the *R. exoculata* symbiotic model.

Key words: *Rimicaris exoculata*, gut epibiosis, hydrothermal vent ecosystems, *Bacteria*, 16S rRNA, phylogeography, microscopy, *in situ* hybridizations.

RESUME

Les sources hydrothermales marines profondes sont des environnements clé dans le domaine de l'évolution du Vivant et sont considérées comme un modèle pour la compréhension des écosystèmes primordiaux. L'absence de lumière, la pression hydrostatique, l'oligotrophie et la variabilité des conditions géochimiques et thermiques observées sont particulièrement contraignantes pour la vie animale. Dans ces écosystèmes, l'énergie motrice est issue de la chimiosynthèse microbienne, contrairement aux écosystèmes marins « de surface », situés dans la zone photique, pour lesquels l'énergie de base est issue de la photosynthèse. Les symbioses entre des invertébrés inféodés aux écosystèmes hydrothermaux marins profonds et des micro-organismes sont fréquentes. Ces interactions durables peuvent être de différente nature (parasitisme, commensalisme, mutualisme, symbiose obligatoire) et jouer différents rôles (trophique, détoxification, contrôle des populations...).

La crevette caridée *Rimicaris exoculata* est une espèce endémique des sites hydrothermaux de la Ride medio-Atlantique (MAR) et représente l'espèce majoritaire de la macrofaune de certains d'entre eux. Chez ce crustacé deux zones de colonisation microbienne sont identifiées mais leur rôle n'est pas encore établi. Une épibiose dense et organisée est décrite sur ses appendices buccaux hypertrophiés. Des travaux préliminaires mettaient en évidence des communautés microbiennes dans son tractus digestif. Le but de mon doctorat était d'étudier les micro-organismes associés au tractus digestif de la crevette par différentes approches afin d'identifier ces communautés microbiennes et de comprendre leurs relations avec l'hôte.

Ce travail a mis en évidence la présence de différentes communautés microbiennes dont une partie serait une communauté bactérienne résidente, spécifique à *R. exoculata*. Cette communauté est représentée par des *Deferribacteres*, des *Mollicutes* et des *Epsilonproteobacteria*. Les approches microscopiques montrent la dominance d'un morphotype filamenteux étroitement associé à l'épithélium intestinal dont la croissance et l'installation semblent être contrôlées par l'hôte. Les approches moléculaires ont permis d'émettre des hypothèses concernant cette épibiose : (1) les épibiontes du site hydrothermal Rainbow présentent une originalité taxinomique laissant supposer une histoire évolutive ancienne tandis que les sites hydrothermaux Logatchev et Ashadzé semblent avoir été colonisés plus récemment par le couple *R. exoculata* et ses épibiontes, (2) les épibiontes, non retrouvés dans le milieu extérieur et monophylétiques le long de la MAR pourraient être transmis verticalement et (3) il s'agirait d'une association mutualiste à caractère obligatoire. Ce travail de recherche a donc permis de poser les bases dans la compréhension du modèle symbiotique digestif *R. exoculata*.

Mots clé: *Rimicaris exoculata*, épibiose digestive, écosystèmes hydrothermaux, *Bacteria*, ARNr 16S, phylogéographie, microscopie, hybridations *in situ*.