Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED 227 « Sciences de la Nature et de l'Homme »

UMR 7208 BOREA (MNHM, UPMC, CNRS, IRD, UCBN)
Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques
Équipe Adaptation aux Milieux Extrêmes (AMEX)

Cycles de vie des symbiontes chez les bivalves des environnements à base chimiosynthétique de l'océan profond

Par Kamil SZAFRAŃSKI

Thèse de doctorat de microbiologie marine

Dirigée par Sébastien DUPERRON

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 25 septembre 2014

Devant un jury composé de :
M. BOROWSKI Christian, Chercheur Senior, Institut Max Planck de Microbiologie Marine à Brême, Rapporteur
M. COMPÈRE Philippe, Chef de Travaux, Université de Liège, Examinateur
M. DUPERRON Sébastien, Maître de Conférences HDR, UPMC, Directeur de Thèse
Mme GAUDRON Sylvie, Maître de Conférences, UPMC, Invitée
M. GHIGO Jean-Marc, Chef de Laboratoire, Institut Pasteur, Examinateur
M. LALLIER François, Professeur, UPMC, Examinateur
Mme LÓPEZ-GARCÍA Purificación, Directrice de Recherche, CNRS, Rapporteur

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Thèse réalisée dans le cadre du programme européen : « Marie Curie Actions »
Initial Training Network (ITN) « SYMBIOMICS » numéro de contrat 264774

Nous n'héritons pas la terre de nos ancêtres, nous l'empruntons à nos enfants.

« Terre des Hommes » Antoine de St-Exupéry (adapté d'un proverbe hindou ou africain)

À ma famille

À mes amis

À mes proches

Remerciements

En premier lieu, je voudrais adresser mes remerciements à mon directeur de thèse, le Docteur Sébastien Duperron avec qui j'ai eu l'opportunité d'effectuer mes travaux de thèse. Sans lui, sans ses conseils précieux ou sans son esprit formateur, ce projet n'aurait pas pu être réalisé. Être un chercheur innovateur et brillant n'est pas tout, il faut aussi être un pédagogue patient pour ne pas utiliser ses étudiants comme main d'œuvre au laboratoire – merci pour tes qualités humaines et le savoir que tu m'as transmis. Je te suis infiniment reconnaissant pour m'avoir fait confiance et m'avoir accepté en thèse malgré mon profil scientifique initialement un peu compliqué. Travailler sous ta direction a été un vrai plaisir. L'autonomie que tu m'as assurée m'a permis de développer ma confiance en moi sur le plan de la recherche. Toutes les pauses café ont été non seulement l'occasion d'échanger des avis scientifiques, mais aussi des moments de détente intellectuelle pour parler de la politique, la société, la culture et la langue françaises. Merci aussi pour ta formation parallèle sur ce plan-là!

Je remercie également Sylvie, ma co-encadrante « non-officielle », une vraie chercheuse passionnée et une excellente formatrice. Sylvie, je te suis reconnaissant pour ton professionnalisme et pour le savoir que tu m'as transmis surtout dans le domaine de l'histologie. Grâce à la collaboration avec toi, mon premier article a pu être publié. Merci à toi et à Sébastien pour votre engagement, pour toutes les corrections de manuscrits et pour vos commentaires précieux.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe AMEX de m'avoir bien accueilli et d'avoir créé non seulement des conditions de travail excellentes mais aussi une ambiance très aimable et familiale. Merci à Bruce, le chef de l'équipe, pour m'avoir donné l'occasion de travailler avec les aquariums à haute pression – tu m'as autorisé à les manipuler de façon autonome et tu m'as emmené en mission – merci pour ta confiance. Merci beaucoup à Juliette pour ses conseils scientifiques, surtout pour m'avoir montré « où est quoi » au laboratoire. Grand merci à Magali, spécialement pour son aide dans la préparation des échantillons pour la microscopie électronique – sans toi, une bonne partie de mon travail n'aurait pas pu être réalisée. J'adresse aussi mes remerciements à Nelly pour son support technique lors des diverses manipes – tes conseils et tes bon mots me motivaient toujours au travail! Merci aussi pour tes cours de français. Merci beaucoup à Clara pour tous les moments passés ensemble au laboratoire – tu étais toujours une bonne conseillère! Je tiens à remercier tous les stagiaires, Bérénice, Nika et Victor, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler au sein de l'équipe – le travail de chacun de vous ainsi que votre engagement ont contribué à ce travail. Finally, thank you very much Sven for sharing the office, life and lab experience and all the important events during our stay in Paris. Thanks to our conversations I have significantly improved my English. We have managed to successfully pass through all the administrative tasks – that was tricky! It was a great and unforgettable time!

Je voudrais transmettre mes remerciements à l'UMR 7208 BOREA et particulièrement à Mme Sylvie Dufour pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon travail de recherche au sein de son unité; pour les mêmes raisons je remercie l'UMR 7138 SAE et en particulier M. Hervé Le Guyader qui m'a accueilli dans son unité de recherche et qui était le directeur de l'École Doctorale ED392 « Diversité du Vivant » au moment de mon recrutement. Je voudrais remercier aussi l'École Doctorale ED 227 « Sciences de la Nature

et de l'Homme » et Mme Gaëlle Boutin qui a assuré le bon déroulement des procédures administratives pendant ma thèse et qui était toujours là pendant le passage vers la nouvelle ED.

Mon travail a été évalué et guidé lors de deux comités de thèse – j'en suis reconnaissant à Mme Purificación López-García, M. Philippe Lopez et à M. Arnaud Tanguy. Merci pour vos remarques, commentaires et pour le temps que vous m'avez consacré.

Je tiens à remercier sincèrement les membres de jury : M. Philippe Compère, M. Jean-Marc Ghigo, M. François Lallier et spécialement les rapporteurs : M. Christian Borowski et Mme Purificación López-García qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci beaucoup d'y avoir consacré votre temps.

J'adresse aussi mes remerciements à l'équipe scientifique Génétique des Adaptations aux Milieux Extrêmes de la Station Marine de Roscoff : François Lallier, Ann Andersen, Stéphane Hourdez, Jean Mary, Anne-Sophie Le Port et en particulier Arnaud Tanguy pour m'avoir donné la possibilité de tenter le séquençage du génome de *Loripes* et pour les moments inoubliables que j'ai passé avec certains à bord du « Pourquoi Pas ? »; aux équipes scientifiques de l'Ifremer de Brest, spécialement à Marie-Anne Cambon-Bonavita pour m'avoir permis d'embarquer pour la campagne océanographique BICOSE; et à l'équipe Diversité, Écologie et Évolution Microbiennes de l'Université Paris-Sud, à Purificación López-García, à David Moreira et particulièrement à Philippe Deschamps avec qui j'ai eu la possibilité de collaborer et réaliser une partie importante de mon projet scientifique. Philippe, grâce à ta formation, j'ai acquis beaucoup de compétences en bioinformatique, qui m'ont permis de rédiger mon deuxième article.

Merci également aux membres du personnel technique et administratif, Danielle, Latiffa et Paula – sans vous et votre engagement dans la vie quotidienne du laboratoire mon travail n'aurait pas avancé. Je voudrais dire « merci » à Philippe Leballeur pour la bonne gestion de ressources tout au long de mon travail de thèse.

Je suis particulièrement reconnaissant à tous les scientifiques, thésards, post-docs et administratifs du consortium « ITN Symbiomics » qui a financé ma thèse. Grand merci à Mme Nicole Dubilier et M. Christian Borowski pour l'organisation de toutes les formations que j'ai suivies, pour les rassemblements annuels, les discussions et commentaires accompagnants grâce auxquels ma recherche était co-encadrée en permanence par les spécialistes internationaux de la symbiose.

Dans mes remerciements je n'oublie pas les personnes qui m'ont beaucoup aidé surtout au moment de la préparation de ma candidature pour cette thèse. Merci mille fois à Emmanuel Koen, Mme Anne Magnet et à M. Jacques Belleville pour leur soutien aux moments où j'ai pris des décisions courageuses, que je n'ai regrettées à aucun moment. La lettre de motivation que vous m'avez aidé à rédiger a été mon billet pour démarrer cette thèse. Merci!

J'adresse aussi mes remerciements aux encadrants de mes stages de licence – Mme Juliette Leymarie, Mme Françoise Corbineau et M. Christophe Bailly de l'équipe « Biologie des Semences » actuellement de Laboratoire de Biologie du Développement UPMC et de mon stage de master 1, à M. Eric Ruelland, travaillant maintenant à l'Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris. Je n'ai que de bons souvenirs de mon travail sous votre direction. Vous m'avez transmis non seulement les bonnes pratiques de

laboratoire, mais aussi la passion pour la recherche. Merci à M. Emmanuel Baudouin pour l'accès à spectrofluorimètre.

Je suis infiniment reconnaissant à Sébastien, Sylvie, Carole, Magali, Anita et Julia pour toutes les corrections linguistiques de ce manuscrit. Merci d'y avoir consacré votre temps libre.

Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans le soutien de mes amis... Merci à (dans l'ordre alphabétique et par famille) Ania, Anita & Adam, Carole, Christophe, Ela, Florent, Guillaume, Joanna, Julia & Krzysiek, Kasia & Michał, Manu, Michał, Michel, Patrycja & Kasia, Seweryn, Sylvain pour tous les moments agréables que j'ai passé avec vous pendant cette période et pour tous vos bons mots. Merci pour votre patience et votre écoute.

Mes remerciements spéciaux au personnel de l'École polonaise où j'ai eu la chance d'habiter pendant presque toute ma thèse. Merci à M. Marek et Mme Zofia Czerny, leur fille Agata Zielonka et au directeur de l'École M. Konrad Leszczyński de m'avoir proposé ce logement agréable, calme et me permettant de travailler en toute efficacité. Vous avez créé une vraie ambiance familiale, grâce à vous je ne me suis jamais senti seul.

Enfin, je voudrais remercier chaleureusement mes parents, ma sœur et ma famille pour leur soutien, encouragements et suivi dans tous mes choix et particulièrement pendant toute mon éducation. Merci à vous pour m'avoir encouragé à apprendre les langues étrangères – au quotidien en dehors de la patrie c'est « pratique ». Plusieurs fois j'ai impressionné les français, même s'il m'arrive de faire des fautes ! Une grande partie de mon succès vous est attribuable.

Pour faciliter la compréhension par tous ceux qui ne parlent pas français je voudrais traduire les trois derniers paragraphes en polonais.

Niniejsza praca nie mogłaby powstać bez wsparcia moich przyjaciół: (w kolejności alfabetycznej i rodzinami) Ania, Anita & Adam, Carole, Christophe, Ela, Florent, Guillaume, Joanna, Julia & Krzysiek, Kasia & Michał, Manu, Michał, Michel, Patrycja & Kasia, Seweryn, Sylvain. Dziękuję Wam za wszystkie przyjemne chwile, które spędziłem z Wami przez ten czas oraz za wszystkie dobre słowa. Dzięki za cierpliwość i pomoc.

Specjalne podziękowania przekazuję pracownikom Szkoły Polskiej w Paryżu, gdzie miałem przyjemność mieszkać podczas prawie całego doktoratu. Szczególnie dziękuję Państwu Markowi i Zofii Czernym, ich córce Agacie Zielonce oraz Kierownikowi Szkoły Panu Konradowi Leszczyńskiemu za zaproponowanie mi tego fantastycznego i spokojnego lokum, gdzie mogłem pracować z pełną wydajnością. Stworzyliście Państwo rodzinną atmosferę, dzięki której nigdy nie czułem się sam.

Na koniec chciałbym gorąco podziękować Rodzicom, Siostrze Luizie oraz całej Rodzinie za wsparcie, którego mi udzielili. Zagrzewaliście mnie do pracy i kibicowaliście moim wyborom podczas całego okresu nauki a szczególnie podczas doktoratu. Jestem Wam szczególnie wdzięczny za wasz wkład i wasze zachęty do nauki języków obcych – to całkiem « praktyczne » w życiu codziennym za granicą... Mimo, że zdarza mi się popełniać błędy, to kilka razy udało mi się zaimponować dobrą znajomością języka. Mój sukces zawdzięczam w dużej mierze Wam!

Liste des abréviations

ACL : ATP citrate lyase
ADN : acide désoxyribonucléique (DNA)
APS : adénosine phosphosulfate réductase
ARNr : acide ribonucléique ribosomique (rRNA)
CARD-FISH : Fluorescence *in situ* hybridization with CAtalyzed Reporter Deposition
CBB : (cycle CBB) le cycle de Calvin-Benson
CHEMECOLI : CHEMosynthetic Ecosystem COlonization by Larval Invertebrates
CTAB : bromure d'hexadécyltriméthylammonium (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique (Ethylène Diamine Tétra Acétique)
FISH : hybridation *in situ* en fluorescence (Fluorescence *in situ* Hybridization)
HCl : chlorure d'hydrogène ou acide chlorhydrique
HRP : peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase)
NMDS : positionnement multidimensionnel (Non-Metric Multidimensional Scaling)
MET : microscopie électronique à transmission (TEM - Transmission Electron Microscopy)
MMO : méthane mono-oxygénase(s)
OTU : unité taxonomique opérationnelle (Operational Taxonomic Unit)
PCR : réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PVP : polyvinylpyrrolidone
RDA : analyse de redondance
RubisCO : ribulose 1-5 bisphosphate carboxylase/oxygénase
SOB : bactéries oxydant le soufre (SOX)
SRB : bactéries sulfato-réductrices
SSCP : polymorphisme de conformation des simples brins
rTCA : (cycle rTCA) le cycle de Krebs inversé (reverse Tri-Carboxylic Acid cycle)
UPGMA : Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Average
pb : paires de bases (bp – base pairs)
L : litre(s)
mM : millimolaire
µM : micromolaire
g : gramme(s)
°C : degré(s) Celsius

Sommaire

Remerciements III
Liste des abréviations VII
Sommaire IX
Avant-propos XI
1. Écosystèmes à base chimiosynthétique 1
1.1 Sources hydrothermales 1
1.1.1 Caractéristiques générales 1
1.1.2 Géologie et propriétés physico-chimiques des sources hydrothermales 2
1.1.3 Géographie des sources hydrothermales 8
1.2 Suintements de fluides froids 9
1.2.1 Caractéristiques générales 9
1.2.2 Géologie et propriétés physico-chimiques 10
1.2.3 Distribution géographique des suintements froids 11
1.3 Débris végétaux 12
1.3.1 Caractéristiques générales 12
1.3.2 Distribution et genèse 12
1.4 Carcasses de baleines 14
1.4.1 Caractéristiques générales 14
1.4.2 Genèse 14
1.5 Biogéographie des écosystèmes à base chimiosynthétique 15
2. Symbioses entre bactéries chimiosynthétiques et métazoaires dans les écosystèmes marins profonds 19
2.1 Définitions de la symbiose 19
2.2 Modèles d'études des associations symbiotiques 20
2.3 Chimiosynthèse dans les environnements marins profonds 21
2.4 Diversité des hôtes qui entrent en symbiose avec des bactéries chimiosynthétiques 22
2.4.1 Annélides dépourvus de tube digestif 24
2.4.2 Symbioses chez les arthropodes 25
2.4.3 Symbioses très diverses des mollusques 26
2.4.4 Bivalves 27
2.5 Diversité des symbiontes chimiosynthétiques 32
2.5.1 Localisation des bactéries 32
2.5.2 Diversité taxonomique des bactéries symbiotiques chimiosynthétiques 33
2.5.3 Les métabolismes des symbiontes 35
2.5.4 Avantages et inconvénients des symbioses multiples 38
3. Cycles de vie des symbiontes 40
3.1 Modes de transmission des symbiontes 41
3.1.1 Transmission horizontale 43
3.1.2 Transmission verticale 45
3.1.3 Transmission mixte 47
3.2 Connectivité 50
3.3 Menaces potentielles liées à l'exploitation des ressources sous-marines 54
4. Objectifs et approches méthodologiques de la thèse 57
4.1 Quelle est la place des formes libres de symbiontes dans les communautés microbiennes? 57
4.2 Comment les symbiontes se transmettent-ils d'une génération à l'hôte ? 60
4.3 Quelle est la dynamique des populations de symbiontes au sein des tissus de leurs hôtes ? Est-elle adaptative? 61

5. Article scientifique 1 « Colonization experiment using plant substratesreveal symbiont related bacteria at hydothermal vents and cold seeps » 63
Résumé 63
Manuscrit soumis 65
Abstract 66
Introduction 67
Material and methods 69
Results 71
Discussion 75
Acknowledgments 80
References 81
Figures 87
Tables 92
Figures et tableaux supplémentaires 96
6. Article scientifique 2 « Direct evidence for maternal inheritance of bacterial symbionts in small deep-sea clams (Bivalvia: Vesicomyidae) » 109
Résumé 110
Annexe 1 122
Annexe 2 123
7. Article scientifique 3 « First insights into the population dynamics of methane- and sulfur-oxidizing symbionts in *Bathymodiolus azoricus* under pressure » 127
Résumé 127
Manuscrit proposé 129
Abstract 129
Introduction 130
Material and methods 132
Results 135
Discussion 138
Conclusions 141
Acknowledgments 142
References 143
Figures 147
Tables 151
8. Discussion générale 157
8.1 La place des formes libres des symbiontes dans l'environnement 157
8.2 Les preuves de la transmission verticale des symbiontes de Vesicomyidae 160
8.3 La dynamique des populations de symbiontes en réponse aux stress abiotiques 162
9. Conclusions et perspectives 165
Bibliographie 169
Annexes 193
Annexe 1 Article scientifique 4 « Diversity of symbioses between chemosynthetic bacteria and metazoans at the Guiness cold seep site (Gulf of Guinea, West Africa) » 193
Annexe 2 Résumé en polonais – Streszczenie pracy 208
Table des illustrations 211
Table des tableaux 217

Avant-propos

A ce jour, l'océan qui occupe plus de 70 % de la surface de la Terre, n'a été étudié que partiellement (Figure 0-1). Avec les nouvelles campagnes océanographiques, la recherche scientifique ne cesse d'approfondir cette exploration. Il existe plusieurs raisons d'étudier l'océan, et la plupart des campagnes océanographiques sont focalisées sur un ou quelques aspects précis. Premièrement, l'océan est le plus vaste – volumineux et le plus diversifié des écosystèmes sur notre planète. Les océans sont responsables de la production d'au moins la moitié de l'oxygène que nous respirons. L'océan mondial constitue une source importante de nourriture pour l'Homme. L'océan influence et assure l'équilibre du climat sur Terre. Il est aussi le réservoir de nombreuses ressources naturelles comme le pétrole, le gaz ou les terres rares. Quatre branches de l'océanographie couvrent des aspects différents de l'étude des mers et océans : la géologie marine étudie les fonds marins, l'océanographie physique analyse les caractéristiques physiques comme les vagues, les marées et les courants, l'océanographie chimique s'intéresse à la composition de l'eau et à son interaction avec l'atmosphère et la biologie marine étudie la vie dans les océans. Nombre des découvertes les plus importantes sont réalisées à l'interface entre ces disciplines, qu'il s'agisse de comprendre les couplages océan climat ou les grands cycles biogéochimiques. Aujourd'hui, l'exploitation du domaine océanique est en plein essor, avec des conséquences possibles pour les générations futures liées à la surpêche, la pollution massive, ou encore l'exploitation de pétrole offshore. Il nous incombe de chercher des moyens de préserver cet héritage avec toute sa richesse pour que dans le futur l'océan tel qu'on en a hérité de nos ancêtres ne soit pas seulement un souvenir. Avant toute exploitation intense d'une ressource naturelle nous devons caractériser l'environnement concerné et estimer l'impact de nos actions. Pour mieux protéger les écosystèmes océaniques il faut les caractériser, donc explorer, recenser, analyser, décrire, connaître et tirer des conclusions de ces études.

Dans le cas de l'océan profond, nous sommes actuellement au meilleur moment pour le faire puisque d'un côté existent des projets d'exploitation des ressources minérales comme le pétrole offshore en eaux profondes ou les nodules polymétalliques, dont les réserves sur les continents risquent d'être bientôt épuisées, et de l'autre côté nous disposons déjà des moyens nécessaires et des technologies appropriées pour explorer et caractériser les grands fonds avant de commencer d'en tirer les bénéfices. Les écosystèmes à base chimiosynthétique tels que les sources hydrothermales ou les suintements de fluides froids, grâce à leur richesse spectaculaire en biomasse, font l'objet de recherches scientifiques depuis la fin des années 1970. Leur découverte a permis à l'humanité de comprendre que même si on peut explorer l'espace, notre planète n'est toujours pas entièrement

connue. Espace et océan profond sont tous deux des milieux extrêmes, hostiles et peu accessibles à l'Homme. Ces milieux sont aux extrémités de la cognition humaine : le vide et les températures basses dans l'espace et de l'autre côté la pression et la température très élevées des sources hydrothermales. On a trouvé de la vie dans les abysses, on espère la trouver un jour sur d'autres planètes. On y envoie des sondes et des satellites, des sous-marins et des véhicules spatiaux, plus récemment des robots télé-opérés et finalement on y installe des observatoires sous-marins et des stations spatiales. La curiosité humaine innée et la volonté de conquérir et d'exploiter de nouveaux « terrains de jeu » nous y poussent, de la même manière que Christophe Colomb lorsqu'il a navigué vers l'Amérique. Que cette comparaison nous encourage à chercher « le nouveau » dans l'océan, mais en même temps, qu'elle soit un avertissement pour ne pas y perdre une partie importante de la Vie qui l'anime, comme nous apprend la triste histoire de la civilisation Inca.

Figure 0-1 : Une carte bathymétrique des océans terrestres centrée sur l'océan Atlantique avec la dorsale médio-atlantique visible sous la forme d'une chaîne de « montagnes sous-marines » au milieu. Les zones côtières (aux profondeurs n'excédant pas 200 m) sont marquées en rose, le talus continental en gris foncé, les plaines abyssales en bleu et les dorsales en gris clair. Source : First Census of Marine Life 2010: Highlights of a Decade of Discovery, 2010 www.coml.org

1. Écosystèmes à base chimiosynthétique

L'histoire de la recherche sur les écosystèmes à base chimiosynthétique a commencé en 1977 avec la découverte des sources hydrothermales à 2500 mètres de profondeur, situées sur le point chaud volcanique des Galápagos au large de l'Amérique du Sud dans l'océan Pacifique (Corliss *et al.*, 1979). Les scientifiques qui y ont plongé, dans le sous-marin *Alvin*, ont confirmé non seulement l'existence des sources thermales sous-marines, supposée auparavant, mais ils ont aussi découvert la faune étonnante et inattendue qui s'y épanouit. Plusieurs hypothèses sur la façon dont les flux d'énergie irriguent cet écosystème particulier ont été faites après cette découverte (Corliss *et al.*, 1979). Finalement, c'est la chimiosynthèse, production primaire réalisée par les procaryotes capables d'utiliser l'énergie d'oxydation des composés réduits des fluides hydrothermaux pour synthétiser des composants organiques, qui a été identifiée comme le processus le plus important (Karl *et al.*, 1980). Des travaux similaires poursuivis dans d'autres régions du monde ont mené à la découverte des suintements de fluides froids abritant une faune similaire dans le golfe du Mexique (Paull *et al.*, 1984; Grassle, 1985). En 1989, Smith et co-auteurs ont prouvé l'existence de proches parents de la faune typique des sources hydrothermales autour d'une carcasse de baleine, trouvée à la profondeur de 1240 mètres dans le golfe de Santa Catalina, sur la côte ouest de l'Amérique du Nord. Finalement, des similarités entre les bivalves colonisant les bois coulés et les autres écosystèmes à base chimiosynthétique ont été suggérées par Distel et collaborateurs (2000). Malgré leurs origines différentes, les quatre écosystèmes à base chimiosynthétique mentionnés ci-dessus partagent certaines espèces ou certains taxons d'animaux (Grassle, 1985; Sibuet and Olu, 1998; Von Cosel *et al.*, 1999; Van Dover, 2000, 2001; Desbruyères *et al.*, 2000, 2001; von Cosel *et al.*, 2001; Dubilier *et al.*, 2008; Duperron *et al.*, 2013a), dont un trait commun est souvent la présence des bactéries symbiotiques dans ou à la surface de leurs tissus. Les symbioses dans l'océan profond seront décrites plus en détail dans un paragraphe suivant. L'objectif de cette partie est de caractériser ces habitats plus en détail pour mieux comprendre leur géographie, leur genèse et leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que de comprendre les traits communs et les différences qui constituent le contexte de mon travail de thèse.

1.1 Sources hydrothermales

1.1.1 Caractéristiques générales

Les sources hydrothermales (Figure 1-1) sont des formations géologiques observées surtout aux profondeurs importantes, mais des sites peu profonds existent aussi. L'activité hydrothermale

résulte des mouvements des plaques tectoniques les unes par rapport aux autres (Hannington *et al.*, 2005). Malgré l'absence totale de la lumière et une pression hydrostatique très élevée à ces profondeurs importantes, on y retrouve une biodiversité étonnante de certains animaux qui ne peuvent y vivre que grâce aux symbioses avec des bactéries chimiosynthétiques qui assurent la production primaire à la base de la chaîne alimentaire (Van Dover, 2000; Govenar, 2012). Les sources hydrothermales, situées sur les dorsales océaniques ou dans les bassins arrière-arc et entourées par les plaines abyssales très pauvres en matière organique, sont souvent qualifiées d'oasis de vie, par leur ressemblance avec les oasis des milieux désertiques terrestres (Carney, 1994). Bien que les distances entre les fumeurs soient souvent importantes, ils sont colonisés par une faune similaire, constituée en général de Mollusques, Arthropodes crustacés et Annélides appartenant aux mêmes familles, genres, voire espèces, ce qui pose la question de la connectivité entre eux, sachant que ces écosystèmes sont éphémères et souvent séparés par des centaines voire des milliers de kilomètres.

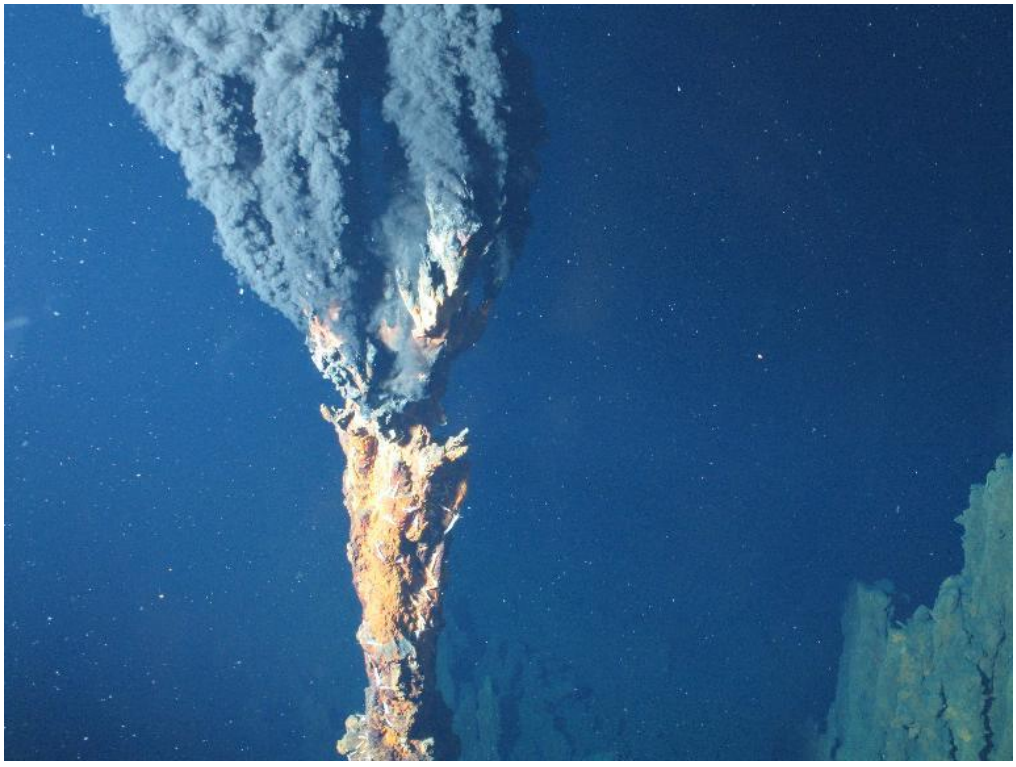


Figure 1-1 : Un exemple de fumeur noir actif d'une source hydrothermale de la dorsale médio-atlantique, site Rainbow, marqueur OBS 57 US, mission BioBaz 2013, plongée 519. Photo Source : Ifremer

1.1.2 Géologie et propriétés physico-chimiques des sources hydrothermales

La formation des sources hydrothermales est liée à l'activité volcanique et sismique, étant la conséquence des mouvements des plaques tectoniques de la lithosphère océanique. Deux types de formations géologiques favorisent la formation des sources hydrothermales : les dorsales médio-

océaniques et les zones de subduction dans les bassins arrière-arc. La géologie des sources hydrothermales a fait l'objet de plusieurs revues scientifiques (Van Dover, 2000; Hannington *et al.*, 2005; Tivey, 2007).

Les dorsales médio-océaniques se développent à la frontière entre deux plaques tectoniques qui s'éloignent (zone de divergence), dans la zone d'accrétion où le plancher océanique est créé *de novo*. Le manteau terrestre remonte à ces endroits, évacue la chaleur du magma, et se solidifie pour former le plancher océanique (Tivey, 2007). Les chaînes des montagnes sous-marines s'y forment, mais suite à l'éloignement des plaques voisinant, un fossé d'effondrement (rift) large de centaines de mètres apparaît au milieu de la dorsale. C'est là que la lave s'écoule, refroidit et devient la nouvelle croûte océanique. La convection de la lave chaude à l'intérieur du manteau assure le flux constant de chaleur vers la surface de la croûte. La lave qui refroidit se rétracte et forme des fissures dans le plancher océanique. Avec la pression élevée du fond, l'eau pénètre dans ces interstices. La percolation de l'eau de mer du fond dans la roche chaude conduit à chauffer le fluide. Sa pression augmente encore avec la hausse de température et les forces de convection font remonter le fluide vers la surface de la croûte, en traversant et lessivant les roches riches en minéraux rencontrées sur son trajet. L'eau chaude s'enrichit ainsi en éléments chimiques solubles à des températures élevées et lessive les minéraux au cours de son trajet (Von Damm, 1995; Tivey *et al.*, 1995). Finalement, comme la nouvelle croûte océanique est fissurée, le fluide bouillant et riche en minéraux ressort à la surface du rift et s'évacue en formant des fumeurs (Tivey *et al.*, 1999). Au contact avec l'eau de mer froide qui entoure les lieux d'émanation, les minéraux précipitent (Alt, 1995). Les particules précipitées adhèrent autour de la sortie du fluide et donnent naissance aux formes spectaculaires des cheminées hydrothermales ou fumeurs, qui peuvent atteindre 20 m de hauteur (Tivey *et al.*, 1999) (Figure 1-2). Le schéma de la circulation d'eau dans la croûte océanique au cours du processus de la formation des sources hydrothermales est présenté sur la Figure 1-3.

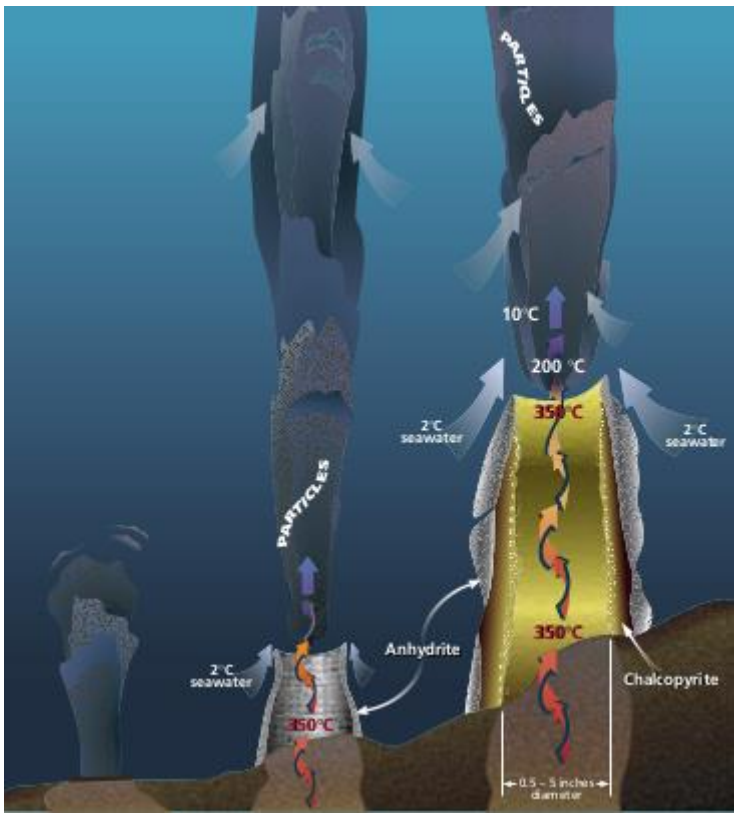


Figure 1-2 : Schéma de la formation d'un fumeur ; le fluide chaud contenant des ions Ca^{2+} se mélange avec l'eau de mer froide qui contient des ions SO_4^{2-}, le sulfate de calcium $CaSO_4$ (ou anhydrite) précipite autour de la sortie du fluide et constitue un support pour la précipitation des autres minéraux. Source : Tivey, 2004

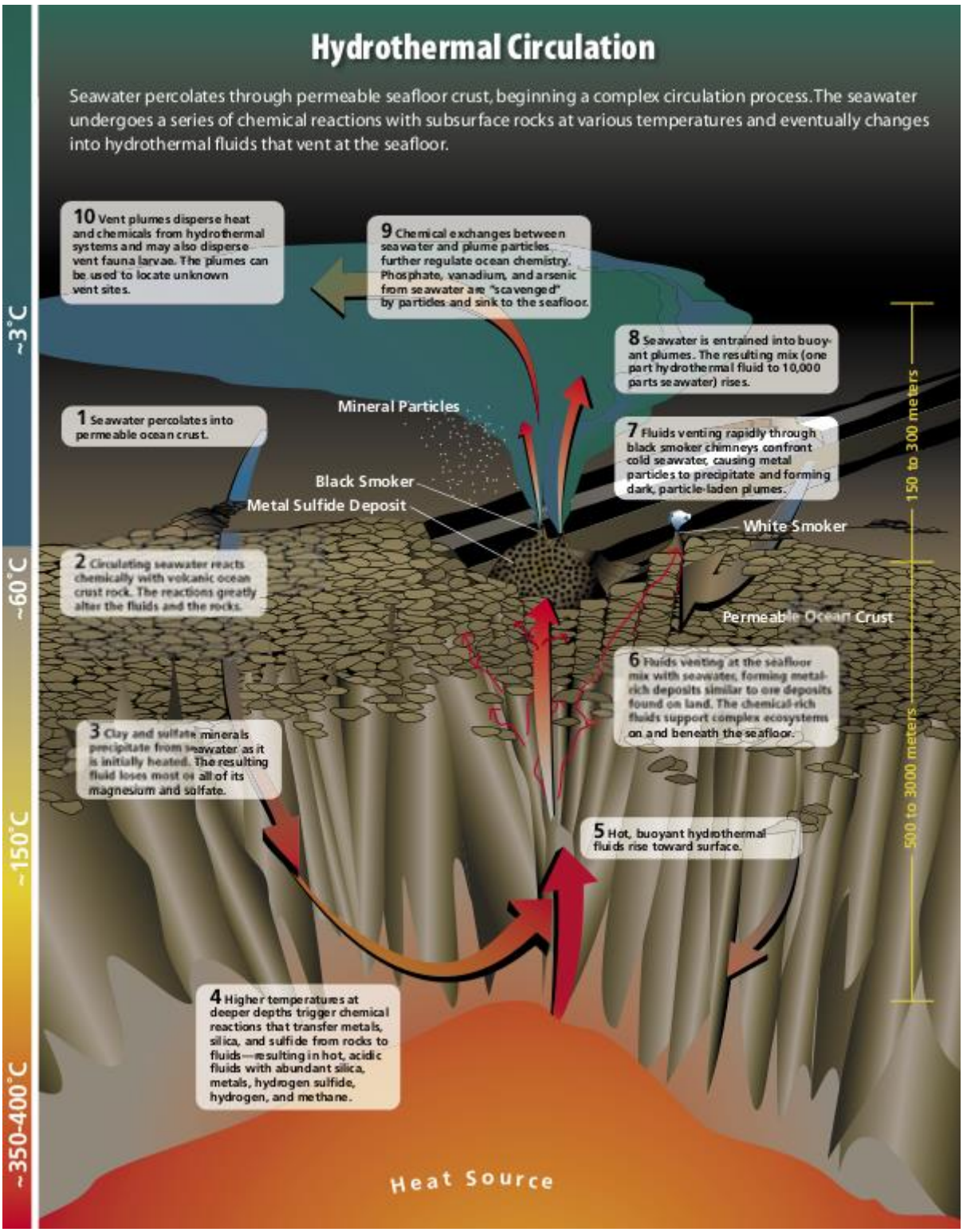


Figure 1-3 : Schéma de la circulation d'eau dans la croûte océanique ; l'eau pénètre dans des fissures du plancher océanique, se réchauffe au contact du magma et sa pression augmente, le fluide remonte vers la surface en traversant et lessivant les roches riches en minéraux, le fluide chaud s'enrichit ainsi en minéraux, ressort à la surface du rift et forme des fumeurs par précipitation au contact avec l'eau de mer froide. Source : Tivey, 2004

Les bassins arrière-arc représentent une autre formation géologique favorisant la formation des sources hydrothermales (Hannington *et al.*, 2005). Ceux-ci se forment à la limite entre les plaques océanique et continentale qui se rencontrent. Les deux plaques convergent et forment la zone de subduction où la plaque océanique est poussée sous la plaque tectonique continentale et continue sa descente dans le manteau terrestre. Les tensions exercent une pression élevée sur le magma qui pénètre les fissures et remonte vers la plaque de surface, créant un arc volcanique parallèle à la zone de subduction. A l'arrière de l'arc volcanique, sur la plaque continentale restant à la surface, il se forme une zone d'extension de la croûte renforcée par la convection du magma. Puisque l'eau de mer peut être injectée dans le magma avec la plaque océanique qui s'enfonce dans le manteau, la composition du magma varie et la chimie des fluides hydrothermaux dans les bassins arrière-arc est différente et plus variable que celle des dorsales océaniques (Tivey, 2007).

Un autre type de sources hydrothermales dont un exemple est Lost City, un site décalé de 15 km en dehors du rift de la dorsale médio-atlantique et aux profondeurs comprises entre 750 et 900 mètres, a été découvert plus récemment (Kelley *et al.*, 2001). Les serpentinites sont les roches qui y dominent dans le plancher océanique, contrairement aux basaltes dans l'axe de la dorsale. Ainsi, la composition du fluide est différente de celles des autres sites. Au cours de la réaction de serpentinisation, les minéraux s'hydratent au contact de l'eau et se transforment en serpentine et en magnétite, produisant du méthane, de l'hydrogène, et de la chaleur qui sont transférés aux fluides (Coleman, 1971).

La température et la composition chimique des roches avec lesquelles le fluide hydrothermal entre en contact lors de sa remontée influence sa composition chimique. L'eau de mer au fond de l'océan est plutôt alcaline et oxygénée, sa température est en général autour de 2 à 4 °C. Le mélange à l'interface du fluide anoxique et de l'eau de mer oxygénée permet les réactions chimiques d'oxydo-réduction et constitue un milieu favorable pour la croissance des communautés bactériennes à base chimiosynthétique (Karl, 1995). En même temps, la composition chimique autour des cheminées varie énormément dans le temps et dans l'espace, suite au mélange turbulent du fluide avec l'eau de mer environnante (Johnson *et al.*, 1988).

Il existe plusieurs types de fumeurs : les fumeurs noirs où le fluide à la sortie du fumeur a une température très élevée (parfois plus de 350 °C) et un pH acide. Le fluide contient surtout du sulfure d'hydrogène (H_2S), parfois du méthane (CH_4), du dioxyde de carbone (CO_2), de l'hydrogène (H_2) et les ions métalliques (Lithium, Fer, Cuivre, Zinc, Plomb, Uranium). Au contact de l'eau froide (2-4 °C), les sulfures métalliques précipitent rapidement et donnent l'impression d'une fumée noire sortant d'une cheminée. De l'autre côté, les fluides riches en sulfates de calcium, de baryum et

silice créent les fumeurs blancs, dont la couleur est un effet de la précipitation des particules de sulfates de calcium, silice et baryte. Leur température est moins élevée (150 – 250 °C) car la paroi est plus poreuse et le fluide se dilue à l'eau de mer avant de sortir. Lost City présente des priopriétés physico-chimiques différentes des autres sources hydrothermales (Kelley *et al.*, 2005). Le fluide y est alcalin (pH 9.0 – 9.8), sa température est moins élevée (40 – 90 °C) et il est plus riche en méthane, hydrogène et magnésium par rapport aux autres sites sur la dorsale médio-atlantique. La hauteur des cheminées à Lost City peut atteindre 60 mètres (Kelley *et al.*, 2001). Les compositions chimiques des fluides des sources hydrothermales de différents sites sont comparées dans le Tableau 1-1.

	Mid-Ocean Ridge	Back-Arc	Rainbow	Lost City	Sediment-Hosted	Seawater
T (°C)	≤ 405	278–334	365	≤ 91	100–315	2
pH (25°C)	2.8–4.5	< 1–5.0	2.8	10–11	5.1–5.9	8
Cl, mmol/kg	30.5–1245	255–790	750	548	412–668	545
Na, mmol/kg	10.6–983	210–590	553	479–485	315–560	464
Ca, mmol/kg	4.02–109	6.5–89	67	< 30	160–257	10.2
K, mmol/kg	-1.17–58.7	10.5–79	20	-	13.5–49.2	10.1
Ba, µmol/kg	1.64–18.6	5.9–100	> 67	-	> 12	0.14
H_2S, mmol/kg	0–19.5	1.3–13.1	1	< 0.064	1.10–5.98	-
H_2, mmol/kg	0.0005–38	0.035–0.5	13	< 1–15	-	-
CO_2, mmol/kg	3.56–39.9	14.4–200	na	bdl	-	2.36
CH_4, mmol/kg	0.007–2.58	.005–.06	0.13–2.2	1–2	-	-
NH_3, mmol/kg	< 0.65	-	-	-	5.6–15.6	-
Fe, µmol/kg	7–18700	13–2500	24000	-	0–180	-
Mn, µmol/kg	59–3300	12–7100	2250	-	10–236	-
Cu, µmol/kg	0–150	.003–34	140	-	< 0.02–1.1	-
Zn, µmol/kg	0–780	7.6–3000	160	-	0.1–40.0	-
Pb, µmol/kg	0.183–0.1630	0.036–3.900	0.148	-	< 0.02–0.652	-
Co, µmol/kg	0.02–1.43	-	13	-	< 0.005	-
Cd, µmol/kg	0–0.910	-	0.130	-	< 0.01–0.046	-
Ni, µmol/kg	-	-	3	-	-	-
SO_4, mmol/kg	0	0	0	1–4	0	28
Mg, mmol/kg	0	0	0	< 1	0	53

Tableau 1-1 : Paramètres physiques (la température et le pH) et composition chimique des fluides de différents sites, des fluides influencés par une couche epaisse du sédiment (Sediment-Hosted) et de l'eau de mer (seawater). Source : Tivey, 2007

1.1.3 Géographie des sources hydrothermales

Les sources hydrothermales sont situées le long des 60000 km de dorsales océaniques et dans les bassins arrière-arc dans plusieurs zones géographiques du monde, en revanche leur distribution est toujours loin d'être entièrement connue (Tyler and Young, 2003). La découverte initiale de ce type d'habitat au point chaud des Galápagos (Corliss *et al.*, 1979) a été suivie de découvertes dans d'autres régions, comme la dorsale est-Pacifique sur la Ride Juan de Fuca (Normark *et al.*, 1982; Tunnicliffe *et al.*, 1986). Dans l'océan Atlantique, les premiers sites hydrothermaux ont été découverts dès 1985 avec le site 'Trans-Atlantic Geotraverse' (TAG) (Rona *et al.*, 1986), puis sur 7 autres sites le long de la dorsale médio-atlantique au sud des Açores (Desbruyères *et al.*, 2000), avec un site éloigné de l'axe de la dorsale – Lost City (Kelley *et al.*, 2001). Finalement les fumeurs ont été découverts dans l'océan Indien (German *et al.*, 1998), sur la dorsale Gakkel dans l'océan Arctique (Edmonds *et al.*, 2003) et sur la dorsale East Scotia Ridge en Antarctique (Reid *et al.*, 2013). La Figure 1-4 montre la distribution mondiale des sites hydrothermaux connus ou inférés, illustrant leur présence régulière le long des dorsales océaniques, et suggère également que certaines zones (notamment autour des pôles) ont été nettement moins explorées.

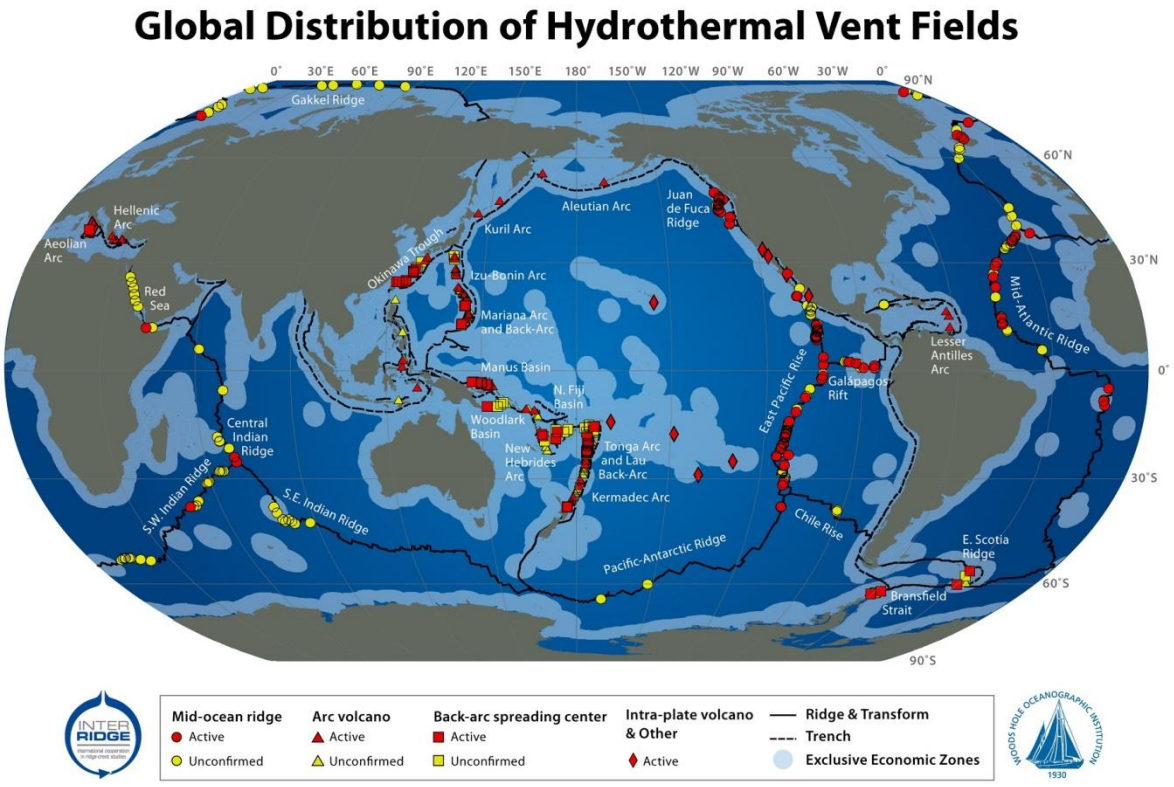


Figure 1-4 : Carte de la distribution globale des sources hydrothermales. Source : Beaulieu *et al.*, 2010, www.interridge.org

1.2 Suintements de fluides froids

1.2.1 Caractéristiques générales

Par opposition aux sources hydrothermales, où on observe l'émission des fluides à températures élevées, les suintements froids sont des sites sous-marins d'émanation permanente de gaz (surtout le méthane) et d'hydrocarbures sous la forme de fluide à des températures basses, n'excédant pas la température de l'eau de mer environnante (Figure 1-5). Les fluides sont anoxiques et peuvent parfois être riches en sulfures. Depuis la découverte des suintements froids dans le golfe du Mexique (Paull *et al.*, 1984), l'existence de milieux similaires a été confirmée sur les marges actives et passives des Océans Atlantique, Pacifique et Indien, mais aussi de la mer Méditerranée, typiquement à des profondeurs comprises entre 400 et 6000 m (Sibuet and Olu, 1998; Sibuet and Olu-Le Roy, 2002), mais des sites moins profonds (autour de 200 m) existent aussi (Dando, 2010). Vingt-quatre sites étaient connus au début du XXIème siècle, de nouveaux sites sont toujours découverts, mais peu d'entre eux ont été caractérisés en détail au niveau biologique (Tunnicliffe *et al.*, 2003). Les suintements froids sont considérés comme des habitats très hétérogènes au niveau géologique, géochimique et biologique (Cordes *et al.*, 2010).

Figure 1-5 : Site d'émission de fluides froids riches en méthane colonisé par les bivalves de la famille des Vesicomyidae enfouis dans un sédiment riche en sulfures. Golfe de Guinée, large de l'Angola, mission Biozaïre 2. Source : Ifremer

1.2.2 Géologie et propriétés physico-chimiques

Sur les marges passives, la présence des suintements froids est liée à des phénomènes géologiques conduisant à l'émanation permanente de pétrole ou de gaz naturel en raison de l'accumulation, de l'enfouissement et de la réduction de matière organique au pied des talus continentaux par les mouvements tectoniques de la croûte ou les avalanches de sédiments sur le talus continental (Figure 1–6A) (Tunnicliffe *et al.*, 2003). Sur les marges actives, les fluides froids sont localisés dans la zone de subduction, au-dessus des accumulations de matière organique sous forme de prisme d'accrétion suite au frottement de la plaque océanique descendant sous la plaque continentale (Figure 1–6B). Le méthane peut être produit par la réduction de la matière organique accumulée dans ce prisme sous l'effet des températures et pressions élevées à ces profondeurs importantes (origine thermogénique des fluides) ou par des processus biologiques des communautés microbiennes (origine biogénique des fluides, notamment par l'action d'archées méthanogènes) (Jannasch and Nelson, D. C., 1984; Kulm *et al.*, 1986). Les fluides traversant le sédiment peuvent être enrichis en sulfure d'hydrogène suite à la réduction des sulfates couplée à l'oxydation anaérobie du méthane par les consortia d'archées et de bactéries présentes dans les couches supérieures du sédiment (Kulm *et al.*, 1986; Masuzawa *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Boetius *et al.*, 2000). Les sources de carbone telles que le méthane, les hydrocarbures ou les hydrates des gaz sont organiques, puisque leurs composants sont d'origine sédimentaire, résultant de l'activité photosynthétique (Simoneit *et al.*, 1990; MacDonald *et al.*, 1994; Aharon, 1994). Les suintements froids peuvent prendre des formes différentes : volcans ou coulées de boue (Olu *et al.*, 1997; Aloisi *et al.*, 2000; Sager *et al.*, 2003), lacs de saumure (Huguen *et al.*, 2004), hydrates de gaz ou croûtes carbonatées (Suess *et al.*, 1999; Sassen *et al.*, 2004) ou pockmarks, dépressions en forme de cratères causées par des fluides remontant du substrat, souvent accompagnés par la précipitation de carbonates *in situ* (authigéniques) liée à l'activité biologique (Kelley *et al.*, 1994). La taille des sites de suintements froids peut varier de quelques mètres jusqu'à plusieurs kilomètres de diamètre (Cordes *et al.*, 2010).

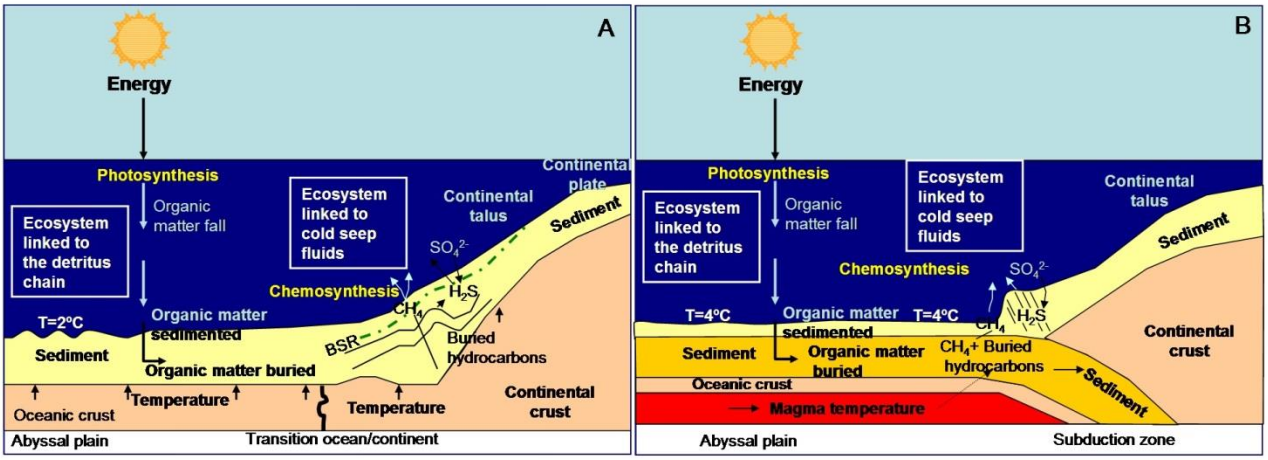


Figure 1-6 : Schémas expliquant le fonctionnement des suintements froids au niveau d'une marge passive (A) et d'une marge active dans la zone de subduction (B). Source : Sibuet and Olu-Le Roy, 2002

1.2.3 Distribution géographique des suintements froids

Les suintements froids sont des habitats répandus sur les talus continentaux et distribués dans différentes régions du monde (revu dans Sibuet and Olu, 1998; Tyler *et al.*, 2002). Dans l'océan Atlantique, ces habitats réduits ont été décrits dans le golfe du Mexique (revu dans Cordes *et al.*, 2009), le golfe de Cadiz (revu dans Cunha *et al.*, 2013b), le golfe de Guinée (Olu-Le Roy *et al.*, 2007b) et à proximité de la Norvège (Haakon Mosby Mud Volcano) (Vogt *et al.*, 1999). En Méditerranée, c'est le site situé en face du delta du Nil – Nile Deep Sea Fan, qui a été le mieux caractérisé (Loncke *et al.*, 2004; Bayon *et al.*, 2009; Dupré *et al.*, 2010). Les suintements froids dans la région de l'océan Pacifique s'étendent depuis le Kamtchatka, par la côte du Japon jusqu'à la Nouvelle Zélande (Lewis and Marshall, 1996), mais ils existent aussi le long des deux continents américains. Ces habitats ont été identifiés aussi dans l'océan Indien, à proximité du Pakistan (Rad *et al.*, 2000). La carte sur la Figure 1–7 présente la distribution mondiale des fluides froids.

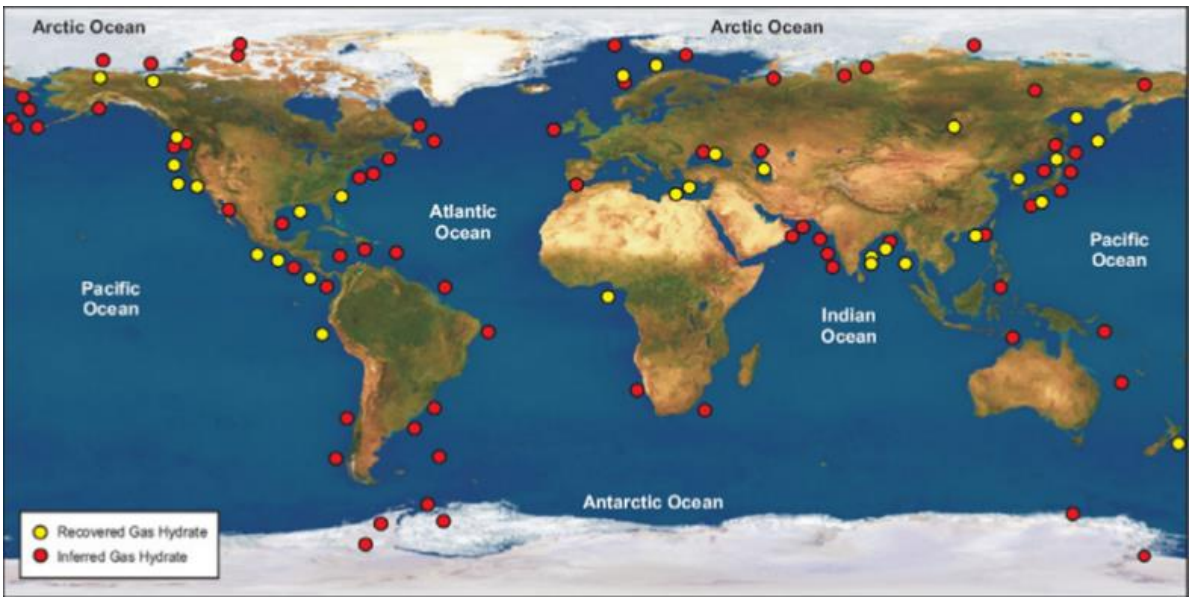


Figure 1-7 : Carte de répartition globale des sites de suintements froids. Source : Krey *et al.*, 2009

1.3 Débris végétaux

1.3.1 Caractéristiques générales

Les bois coulés, le kelp et d'autres types de substrats organiques coulés dans l'océan profond deviennent des micro-écosystèmes réduits, à durée de vie limitée et dispersés dans l'océan *a priori* au hasard, mais plus fréquents dans les zones tropicales avec des grands fleuves traversant les forêts (Turner, 1973). Paradoxalement, ces substrats sont immédiatement repérés et colonisés par les microorganismes et des animaux opportunistes et spécialistes qui les transforment en points chauds (hotspots) de diversité, quelle que soit leur localisation (Turner, 1973; Wolff, 1979; Pailleret *et al.*, 2007; Laurent *et al.*, 2009; Gaudron *et al.*, 2010). La dégradation anaérobie de la cellulose et des lignines induit la production de sulfures (Leschine, 1995), qui permet le développement des bactéries chimiosynthétiques, ainsi que de la faune symbiotique caractéristique des milieux à base chimiosynthétique (Laurent *et al.*, 2009). On y observe certains taxons présents autour des sources hydrothermales et des suintements froids, d'où l'intérêt d'étudier les bois coulés en tant que vecteurs potentiels de la diversité dans l'océan profond (Distel *et al.*, 2000).

1.3.2 Distribution et genèse

Les bois coulés sont distribués dans tous les océans à toute profondeur, mais la probabilité de les trouver augmente à proximité des embouchures des grands cours d'eau, le long des côtes boisées et des anciens couloirs maritimes (Wolff, 1979) .Une fois au fond de l'océan, les couches inférieures du bois deviennent un habitat anaérobie grâce à l'activité des microorganismes dégradant

ses composants majeurs (hemicellulose, cellulose, et lignines) (Laurent *et al.*, 2009; Fagervold *et al.*, 2012, 2013; Bienhold *et al.*, 2013). La dégradation du bois dans l'océan profond se déroule en plusieurs étapes (Figure 1-8) (Fagervold *et al.*, 2012; Bienhold *et al.*, 2013). Dans la Méditerranée orientale, Bienhold et co-auteurs (2013) ont montré pendant une expérience menée pendant un an, que les bivalves foreurs du bois colonisent le substrat rapidement, des bactéries décomposant la cellulose produisent le sulfure d'hydrogène et attirent ainsi la faune à base chimiosynthétique. Le microbiome associé aux bois coulés a été analysé par plusieurs groupes des chercheurs avec des méthodes diverses. (Palacios *et al.*, 2009) ont suggéré des similarités au niveau de la composition de la communauté microbienne avec d'autres écosystèmes à base chimiosynthétique en analysant le polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP). Fagervold et co-auteurs (2012) ont démontré la co-existence des bactéries sulfato-réductrices (SRB), des archées méthanogènes et des bactéries oxydant le soufre (SOB). Finalement, les changements dans la composition de la communauté microbienne en fonction du temps de déploiement ont été analysés par Bienhold et co-auteurs à partir de deux sites (2013).

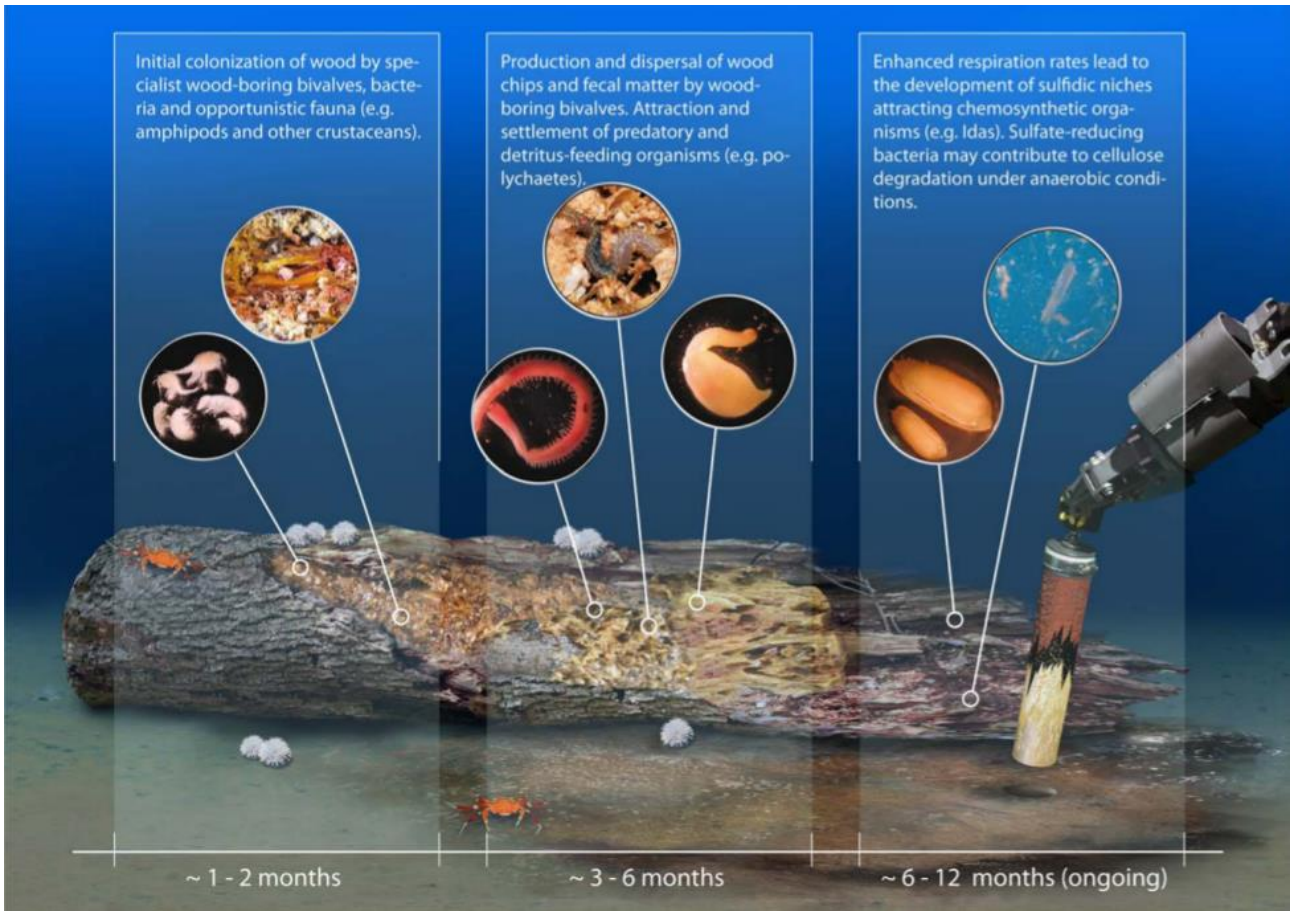


Figure 1-8 : Schéma expliquant les étapes de la colonisation des bois coulés par des bivalves foreurs du bois, puis par des bactéries décomposant la cellulose, finalement par la faune à base chimiosynthétique. Source : Bienhold *et al.*, 2013

1.4 Carcasses de baleines

1.4.1 Caractéristiques générales

Même si les carcasses de baleines ne font pas l'objet d'étude dans cette thèse, elles font parties des types d'environnements à considérer. C'est le dernier type de milieu marin à base chimiosynthétique découvert en 1989 dans le golfe de Santa Catalina, et il présente des similarités au niveau écologique avec les bois coulés (Smith *et al.*, 1989). Ces habitats sont aussi limités à l'échelle du temps et dispersés dans l'océan au hasard, principalement le long des routes migratoires, mais étant donnée la quantité importante (30 – 160 tonnes) de matière organique par carcasse de baleine, la durée de vie de ces habitats est significativement plus longue que dans le cas de débris organiques ou même de certaines sources hydrothermales. L'apport de carbone par un cadavre de baleine à un milieu oligotrophe correspond, en un seul pulse, à l'équivalent d'environ 2000 ans de flux de particules organiques sur le plancher océanique ($2.\ 10^6$ g de C) (Smith and Baco, 2003). Les questions sur le rôle écologique des carcasses dans la chaîne alimentaire de l'océan profond ont été posées bien avant la découverte des symbioses chimiotrophes (revu dans Baco and Smith, 2003; Smith and Baco, 2003).

1.4.2 Genèse

La décomposition des tissus d'une baleine morte, s'effectue en 4 phases (Smith and Baco, 2003). Tout d'abord, les charognards se nourrissent des tissus mous. Ensuite, des opportunistes dont des crustacés et polychètes colonisent les os et les sédiments enrichis autour de la carcasse, se nourrissent des restes de tissus mous laissés par les charognards. La phase sulfophile voit ensuite les microorganismes hétérotrophes sulfatoréducteurs coloniser les os et produire des sulfures pendant la dégradation anoxique des lipides des os ou du collagène. Une production de méthane peut aussi avoir lieu au cours de cette phase (Goffredi *et al.*, 2008b). La synthèse de sulfures et de méthane attire les bactéries oxydant le soufre et les méthanotrophes et crée un milieu optimal pour les symbioses chimiotrophes. Enfin, une phase de récif advient, lorsqu'il n'y a plus de matière organique sur la baleine, les restes minéraux servent de support et sont colonisés par les suspensivores. Ce scénario de décomposition d'une baleine morte a été déterminé en s'appuyant sur une série de cinq expériences effectuées dans le milieu marin profond, dont deux carcasses naturelles et trois déploiements (Bennett *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1998; Baco and Smith, 2003; Smith and Baco, 2003; Smith, 2006). Jusqu'à maintenant, la plupart des carcasses ont été étudiées au large de la Californie dans le bassin de Santa Catilina (Smith and Baco, 2003), et une observation de 3 ans a été effectuée au sud du Japon à la profondeur de 250 mètres (Figure 1-9)

(Fujiwara *et al.*, 2007). Les carcasses de baleines sont caractérisées par la plus grande diversité connue d'espèces animales colonisant les substrats durs dans l'océan profond (Baco and Smith, 2003). Une baleine de 30 tonnes peut maintenir un habitat à base chimiosynthétique pendant des dizaines d'années après sa mort (Treude *et al.*, 2009).

Figure 1-9 : Un exemple de la faune colonisant une carcasse de baleine de 13,5 m de longueur, trouvée à 254 m de profondeur au Cap Nomamisaki au Japon. Photo prise en juillet 2005. Source : Fujiwara *et al.*, 2007

1.5 Biogéographie des écosystèmes à base chimiosynthétique

D'après le recensement de la faune des sources hydrothermales le plus récent, plus de 500 espèces des métazoaires colonisent exclusivement ces habitats, dont au moins 35 espèces sont également présentes dans les zones de suintements froids ou sur les carcasses de baleines. Les mollusques, les arthropodes et les polychètes sont des groupes majoritaires et constituent respectivement 36%, 34% et 18% de tous les animaux présents dans ces habitats (Wolff, 2005). Parmi les mollusques, presque 200 espèces sont considérées comme associées avec des bactéries symbiotiques. Les associations symbiotiques ont été développées indépendamment chez les bivalves d'au moins 5 familles : Mytilidae, Vesicomyidae, Solemyidae, Lucinidae et Thyasiridae, et sont suspectées chez plusieurs autres familles (revu dans Duperron *et al.*, 2013a). La répartition géographique hétérogène de la multitude des espèces colonisant les sources hydrothermales a donné naissance à la notion de provinces biogéographiques (Van Dover *et al.*, 2002). La première province identifiée était celle de la dorsale est-Pacifique, dominée par les vestimentifères tubicoles *Riftia pachyptila*, les bivalves *Calyptogena magnifica* et *Bathymodiolus thermophilus*, et une multitude d'espèces plus petites incluant des gastéropodes et polychètes (Hessler and Smithey, 1983; Fustec *et al.*, 1987). Les différences importantes entre cette faune et celle colonisant les sites de la dorsale médio-atlantique ont été décrites par Desbruyères et co-auteurs (2000). La faune est dominée par les crevettes et les moules, et la diversité des espèces est plus importante. Les parois des cheminées sont colonisées par la crevette *Rimicaris exoculata* et des moules du genre *Bathymodiolus*, à la base des fumeurs, on trouve les crevettes *Mirocaris fortunata* et *Chorocaris chacei* et des moules *Bathymodiolus* spp. et finalement aux alentours des sites actifs les moules

Bathymodiolus spp. sont dominantes (revu dans Desbruyères *et al.*, 2000). A la découverte des moules du genre *Bathymodiolus*, il a été suggéré que c'est un des taxons les plus répandus – identifié sur les sources hydrothermales dans les Océans Atlantique, Pacifique et Indien et sur les suintements froids du golfe du Mexique (MacDonald *et al.*, 1990).

Les communautés animales colonisant les sites de fluides froids sont clairement structurées dans l'espace en fonction des conditions hydrologiques et géochimiques (Levin, 2005). Autour des points d'émission du méthane et éventuellement des sulfures, un écosystème particulier, alimenté par les bactéries chimiosynthétiques, est établi. En cas d'absence de substrats durs (par exemple des carbonates), ces habitats sont dominés par des tapis des bactéries sulfo-oxydantes ou par des clams (par exemple *Calyptogena ponderosa*, *Vesicomya cordata* et *Lucinoma* spp.) mobiles (MacDonald *et al.*, 1990). La biomasse de cette mégafaune excède largement celle des sédiments environnants (revu dans Sibuet and Olu-Le Roy, 2002). La mégafaune des suintements froids est représentée par des nombreux phylums marins (Sibuet and Olu, 1998; Levin, 2005). Elle est dominée par les bivalves, surtout les moules de la famille des Mytilidae et les clams de la famille des Vesicomyidae, ainsi que par les polychètes siboglinidés, tous associés en symbiose avec des bactéries chimioautotrophes. D'autres groupes comme les arthropodes, les spongiaires et les mollusques gastéropodes peuvent aussi y être présents. Les bivalves (5 espèces) et les polychètes siboglinidés (6 espèces) contenant des bactéries symbiotiques dominent la faune du golfe du Mexique (Cordes *et al.*, 2009). C'est l'une des régions les mieux étudiées, souvent utilisée pour illustrer ce type d'écosystème. En fonction de la nature du suintement, on observe une spécialisation : les clams des familles des Vesicomyidae, Lucinidae et Thyasiridae forment des agrégats au voisinage des suintements dans le sédiment (MacDonald *et al.*, 1990), les carbonates sont colonisés plutôt par les moules de la famille des Mytilidae et par les vestimentifères (Sassen *et al.*, 1993; MacDonald *et al.*, 2000), tandis que le voisinage des hydrates de gaz et des émission de méthane en bulles, aux flux plus importants, est préférentiellement colonisé par les vestimentifères (MacDonald *et al.*, 2003). Dans le golfe du Guinée, Olu-Le Roy et collaborateurs (2007b) ont montré que ce sont les mêmes genres et familles de métazoaires, notamment des Mytilidae (*Bathymodiolus* sp.), des Vesicomyidae (*Calyptogena* sp., '*Vesicomya*' aff. Chuni) et des polychètes siboglinidés (*Escarpia southwardae*), que l'on rencontre dans le pockmark Régab, de 800 mètres de diamètre. Certaines espèces sont partagées avec le golfe du Mexique. Parmi 366 espèces trouvées dans le golfe de Cadiz, 22 appartenaient soit aux bivalves ou aux siboglinidés (Cunha *et al.*, 2013b). La plupart des sources hydrothermales et des suintements froids connus partagent les mêmes familles de métazoaires (Sibuet and Olu, 1998; Dubilier *et al.*, 2008; Duperron *et al.*, 2013a).

Les analyses de la faune associée aux bois coulés ont été effectuées bien avant la découverte des écosystèmes à base chimiosynthétique (Turner, 1973; Wolff, 1979) et les références historiques citées). La première expérience sur la colonisation du bois dans l'océan profond (Turner, 1973) a été menée pendant 104 jours à la profondeur de 1830 mètres, à 180 km au sud de Woods Hole (Massachusetts, États-Unis). Elle a démontré la colonisation du bois par deux espèces de bivalves foreurs *Xylophaga* sp. et *Xyloredo ingolfia*. En 1979, une liste d'environ 50 espèces animales colonisant le bois et les débris des herbiers marins transportés dans les grands fonds marins par les courants turbulents, a été publiée par Wolff (1979). Cette étude a mis en évidence deux types de colonistes : les opportunistes qui utilisent les débris des plantes comme un abri (les polychètes) ou un support (les bivalves de la famille des mytilidés) et les spécialistes qui se nourrissent du bois (les mollusques bivalves foreurs, cocculines et chitons). Avec la découverte des symbioses à base chimiosynthétique dans ces milieux, une nouvelle lumière a été jetée sur ces habitats. Les symbiontes métabolisent le sulfure d'hydrogène et/ou le méthane de la même façon que sur les sources hydrothermales et les suintements froids (Duperron *et al.*, 2008a; Lorion *et al.*, 2009). L'observation des mêmes taxons des bivalves au niveau des sources hydrothermales, des suintements froids, sur des carcasses de baleines et des bois coulés a poussé à la formulation d'une hypothèse sur le rôle de ces derniers dans l'évolution et la dispersion des communautés à base chimioautotrophe (Distel *et al.*, 2000). Cette hypothèse, soutenue par des analyses phylogéniques menées sur les espèces des moules communes pour ces écosystèmes (Duperron *et al.*, 2008a; Lorion *et al.*, 2009), a déclenché une multitude d'études où les substrats végétaux sont considérés comme des relais pour la colonisation de l'océan profond (Pailleret *et al.*, 2007, 2007; Lorion *et al.*, 2009; Gaudron *et al.*, 2010; Fagervold *et al.*, 2012, 2013, 2014; Bienhold *et al.*, 2013). Des études de colonisation similaires ont aussi été menées pour les sites hydrothermaux (Gaudron *et al.*, 2010; Bienhold *et al.*, 2013). Grâce à ces travaux, un nombre important de taxons des bivalves, gastéropodes, annélides polychètes et arthropodes a été identifié comme la faune attachée aux bois coulés. Des spécialistes du genre *Xylophaga* y sont presque systématiquement présents (Gaudron *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2013; Fagervold *et al.*, 2014), tandis que les moules du genre *Idas* sont un excellent exemple de la polyvalence et de l'adaptation aux différents types d'écosystèmes à base chimiosynthétique (Duperron *et al.*, 2008a; Lorion *et al.*, 2009, 2012; Gaudron *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2013; Bienhold *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2013a).

La faune colonisant les carcasses de baleine est différente de la faune environnante car 97 % des individus appartiennent à des espèces rares ou absentes en dehors de ces habitats (Bennett *et al.*, 1994). La diversité dépend de la phase de décomposition d'une carcasse. Pendant les deux premières phases, 38 et 18 espèces des métazoaires ont été identifiées respectivement, tandis qu'au

cours de la phase sulfophile presque 200 espèces ont été trouvées (Baco and Smith, 2003). Sept espèces caractéristiques pour cette phase sont communes avec les bois coulés, 11 espèces sont observées aussi sur les sources hydrothermales et 20 sur les suintements froids (Baco and Smith, 2003; Smith and Baco, 2003). Parmi les espèces symbiotiques les plus abondantes dans ces habitats, on trouve les moules Mytilidae (*Idas* spp. et *Adipicola pacifica*) et les clams de la famille des Vesicomyidae (*Calyptogena pacifica* et *Vesicomya gigas*) et Lucinidae (*Lucinoma annulata*). *Osedax* spp. (Siboglinidés) est un genre spécialiste typique des carcasses de baleine et qui ne colonise que les os dans le milieu marin profond, utilisant des bactéries hétérotrophes localisées dans une 'racine' pour dégrader le collagène des os (Rouse *et al.*, 2004; Glover *et al.*, 2005).

Les groupes d'animaux, colonisant les sources hydrothermales, les suintements froids et les débris organiques dans l'océan profond et qui entrent en symbioses avec les bactéries chimiosynthétiques sont présentées dans le chapitre 2.4 Diversité des hôtes qui entrent en symbiose avec des bactéries chimiosynthétiques.

2. Symbioses entre bactéries chimiosynthétiques et métazoaires dans les écosystèmes marins profonds

Contrairement à la zone photique de l'océan, dont la limite se situe environ à 200 mètres de profondeur, et aux écosystèmes terrestres où la production primaire est assurée majoritairement par la photosynthèse, les milieux marins profonds se caractérisent par une absence de lumière et par conséquent la production primaire photosynthétique y est impossible. Jusqu'à la découverte des sources hydrothermales en 1977 (Corliss *et al.*, 1979) et ultérieurement des suintements froids (Paull *et al.*, 1984), deux écosystèmes riches en biomasse, l'océan profond était considéré comme un milieu désertique. La chimiosynthèse, menée par les procaryotes, a été vite identifiée comme la source majeure de production primaire dans ces écosystèmes (Karl *et al.*, 1980). Ce processus considéré auparavant comme marginal, a été démontré comme étant à la base du fonctionnement de ces écosystèmes extrêmes, à travers l'activité de procaryotes libres, mais surtout au travers des associations symbiotiques entre bactéries sulfo-oxydantes et métazoaires tels que *Riftia pachyptila* (Vestimentifères) (Cavanaugh *et al.*, 1981; Felbeck, 1981) et *Calyptogena magnifica* (bivalve Vesicomyidae) (Fiala-Medioni and Metivier, 1986). Un autre type de symbiose, entre des bactéries méthanotrophes et les bivalves de la famille des Mytilidae a été décrit par Childress et co-auteurs (1986). La faune colonisant les sources hydrothermales, les suintements froids et les débris organiques dans l'océan profond est similaire, avec des représentants des mêmes phylums, familles, genres, et plus rarement espèces (Grassle, 1985; Sibuet and Olu, 1998; Von Cosel *et al.*, 1999; Van Dover, 2000, 2001; Desbruyères *et al.*, 2000, 2001; von Cosel *et al.*, 2001; Ramirez-Llodra *et al.*, 2007; Dubilier *et al.*, 2008; Duperron *et al.*, 2013a). Les symbiontes des hôtes de familles différentes sont parfois phylogénétiquement proches (Stahl *et al.*, 1984; Distel *et al.*, 1988; Dubilier *et al.*, 2008; Nakagawa and Takai, 2008; Lorion *et al.*, 2009). Les écosystèmes à base chimiosynthétique ont été caractérisés dans le paragraphe précédent, l'objectif de cette partie est de décrire les associations symbiotiques dans l'océan profond et leur fonctionnement, de rappeler leur importance fondamentale dans ces écosystèmes, leur diversité, leurs métabolismes possibles, les relations hôtes symbiontes, et la question des formes libres des bactéries symbiotiques.

2.1 Définitions de la symbiose

Les interactions entre les organismes font l'objet de nombreuses études scientifiques. Le terme de « symbiose » a ses origines dans la langue grecque où le mot « sumbiôsis » veut dire « vivre ensemble ». Il a été introduit par Anton de Bary en 1879 pour définir une association

quelconque entre deux espèces différentes. Cette définition très large inclut aussi les associations pathogènes ou les parasites. Elle n'a pas été acceptée dans le milieu scientifique pour des raisons psychologiques, car dans la conscience humaine, il est difficile de considérer des maladies mortelles comme interactions symbiotiques. En tout cas, la définition de symbiose a été depuis longtemps l'objet de débats scientifiques. La question centrale de ce débat concerne le bénéfice mutuel de l'association symbiotique, qui dans la plupart des cas est impossible à mesurer. C'est pour cela qu'Angela Elizabeth Douglas, une spécialiste anglaise de la symbiose et l'auteur du livre « Symbiotic interactions » a proposé qu'au lieu de considérer les bénéfices mutuels de l'association symbiotique, il fallait se concentrer sur l'acquisition d'une nouvelle compétence métabolique par l'un des partenaires (Douglas, 1994). D'après Douglas Zook, un autre spécialiste dans ce domaine, la symbiose, en plus de l'acquisition d'une nouvelle compétence métabolique, nécessite la formation d'une nouvelle structure pour accueillir les partenaires symbiotiques. Cette structure devrait présenter un avantage suffisant pour être positivement sélectionnée par la sélection naturelle (Zook, 1998). Malgré la multitude des définitions possibles, des définitions simples, ayant un sens large et ne s'excluant pas mutuellement existent. La définition acceptée largement par la communauté scientifique est proche du mutualisme : la symbiose est une association entre espèces différentes où chaque participant tire des bénéfices de cette association. Par convention, l'hôte est le partenaire de plus grande taille qui accueille un symbionte – un organisme plus petit. Le thème des symbioses est discuté sous divers aspects soutenus par de nombreux exemples dans des livres de Angela E. Douglas (Douglas, 1994, 2010).

2.2 Modèles d'études des associations symbiotiques

Il a été suggéré que les symbioses sont à l'origine des cellules eucaryotes, dans lesquelles les chloroplastes et les mitochondries ont évolué en organites par endosymbiose de cyanobactéries ou de bactéries pourpres respectivement (la théorie endosymbiotique) (Sagan, 1967; Margulis, 1970; Kutschera and Niklas, 2005). Les Alphaproteobacteria *Wolbachia pipientis* sont des symbiontes (considérés par certains auteurs comme parasites) intracellulaires des insectes, crustacés, et de certains nématodes (Stouthamer *et al.*, 1999). Chez les tiques *Ixodes ricinus*, les bactéries symbiotiques intracellulaires ont été détectées dans les ovocytes et à l'intérieur des mitochondries des ovocytes (Sacchi *et al.*, 2004; Rymaszewska, 2007). Les *Rhizobium* entrent en symbiose avec les cellules des racines des plantes légumineuses (comme le pois, le haricot, le soja, l'arachide et la luzerne) en formant des nodosités, et qui permettent à la plante de fixer l'azote atmosphérique, grâce à l'enzyme nitrogénase synthétisée par la bactérie et dont les plantes eucaryotes sont dépourvues (van Rhijn and Vanderleyden, 1995; Oldroyd, 2013). Chez les insectes, plusieurs espèces modèles

existent, comme par exemple le puceron et son symbionte *Buchnera aphidicola* (Buchner, 1965). Dans cette association, le symbionte est responsable de la synthèse de certains acides aminés essentiels au puceron et dont la quantité est limitée dans la sève du phloème des plantes dont il se nourrit exclusivement (Baumann *et al.*, 1997; Douglas, 2007). Il a été montré que c'est une symbiose très « vieille » qui date d'il y a 200 millions d'années et dont les deux partenaires sont entièrement dépendants (Moran *et al.*, 1993; Moran and Wernegreen, 2000). Dans l'intestin des termites on trouve entre 10^6 et 10^8 cellules de protistes, bactéries et archées, structurées en communauté dont la majorité des membres sont des Bacteroidetes ou des Proteobacteria symbiotiques qui participent à la digestion de la cellulose, des hémicelluloses et des xylanes contenus dans le bois (Cleveland, 1926; Eutick *et al.*, 1978; Hongoh *et al.*, 2003; Nakajima *et al.*, 2005). Ce sont des modèles dont la culture est relativement simple et rapide, c'est pour cela que les études sur les symbioses chez les plantes ou les insectes sont beaucoup plus avancées que celles portant sur l'océan profond, car ce dernier reste peu accessible et le maintien des animaux des grands fonds en laboratoire pour l'expérimentation directe n'est possible que sur quelques espèces de sites peu profonds. La reproduction et le développement des organismes terrestres ou marins côtiers peuvent être suivis « en temps réel » contrairement aux animaux vivants dans les grandes profondeurs de l'océan où ce type d'analyses reste limité par la quantité et la qualité du matériel fixé à bord lors de campagnes océanographiques occasionnelles.

2.3 Chimiosynthèse dans les environnements marins profonds

La chimiosynthèse est un ensemble de réactions biochimiques de conversion de molécules à un atome de carbone (comme CH_4 ou CO_2) en éléments nutritifs utilisables pour constituer de la matière organique, en utilisant l'énergie de l'oxydation de composés chimiques réduits, notamment l'hydrogène (H_2), le sulfure d'hydrogène (H_2S) ou le méthane (CH_4). Winogradsky, un biologiste russe, a été le premier, vers la fin des années 1880, à découvrir la chimiolithotrophie et le concept de la fourniture d'énergie à partir d'oxydations inorganiques (anorgoxydation). Dans l'océan profond, les sources hydrothermales, les suintements froids et les débris organiques se trouvent dans des zones peu influencées par l'apport énergétique de la photosynthèse de surface, mais présentent des composés chimiques réduits (H_2S, H_2 et CH_4 par exemple) et de bons accepteurs d'électrons (O_2, NO^{3-}, SO_4^{2-} par exemple), constituant un milieu idéal pour la production d'énergie par chimiosynthèse. Celle-ci fournit l'énergie nécessaire à la fixation autotrophe de carbone, et est donc responsable de la production primaire dans ces écosystèmes. Les procaryotes chimiosynthétiques, autonomes ou sous la forme de symbiontes, sont donc à la base du réseau trophique. La faune colonisant ces habitats est en grande partie dépendante des symbioses avec de telles bactéries

(Dubilier *et al.*, 2008), car les animaux eux-mêmes sont toujours hétérotrophes. Le plus souvent ce sont des bactéries sulfo-oxydantes, mais des symbioses avec les bactéries méthanotrophes ou des symbioses multiples avec plusieurs bactéries à métabolismes différents ont été identifiées (Childress *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1993; Distel and Roberts, 1997; Woyke *et al.*, 2006; Duperron *et al.*, 2007, 2008b).

2.4 Diversité des hôtes qui entrent en symbiose avec des bactéries chimiosynthétiques

Même si l'océan profond reste peu exploré, un nombre important d'animaux qui entrent en symbiose avec des bactéries chimiosynthétiques est déjà connu (Ramirez-Llodra *et al.*, 2007; Dubilier *et al.*, 2008; Duperron *et al.*, 2013a). La diversité des habitats à base chimiosynthétique varie en fonction de « provinces » géographiques, mais ce sont en moyenne les mêmes groupes taxonomiques que l'on y retrouve (Ramirez-Llodra *et al.*, 2007). Trois groupes majeurs d'animaux, les annélides, les arthropodes et les mollusques, constituent la biomasse la plus importante des écosystèmes à base chimiosynthétique grâce à leurs associations symbiotiques, avec des modalités variées d'association (revu dans Dubilier *et al.*, 2008). On les appelle les espèces fondatrices (Govenar, 2010). Les exemples des habitats à base chimiosynthétique et la diversité des animaux qui les colonisent sont présentés sur la Figure 2-1.

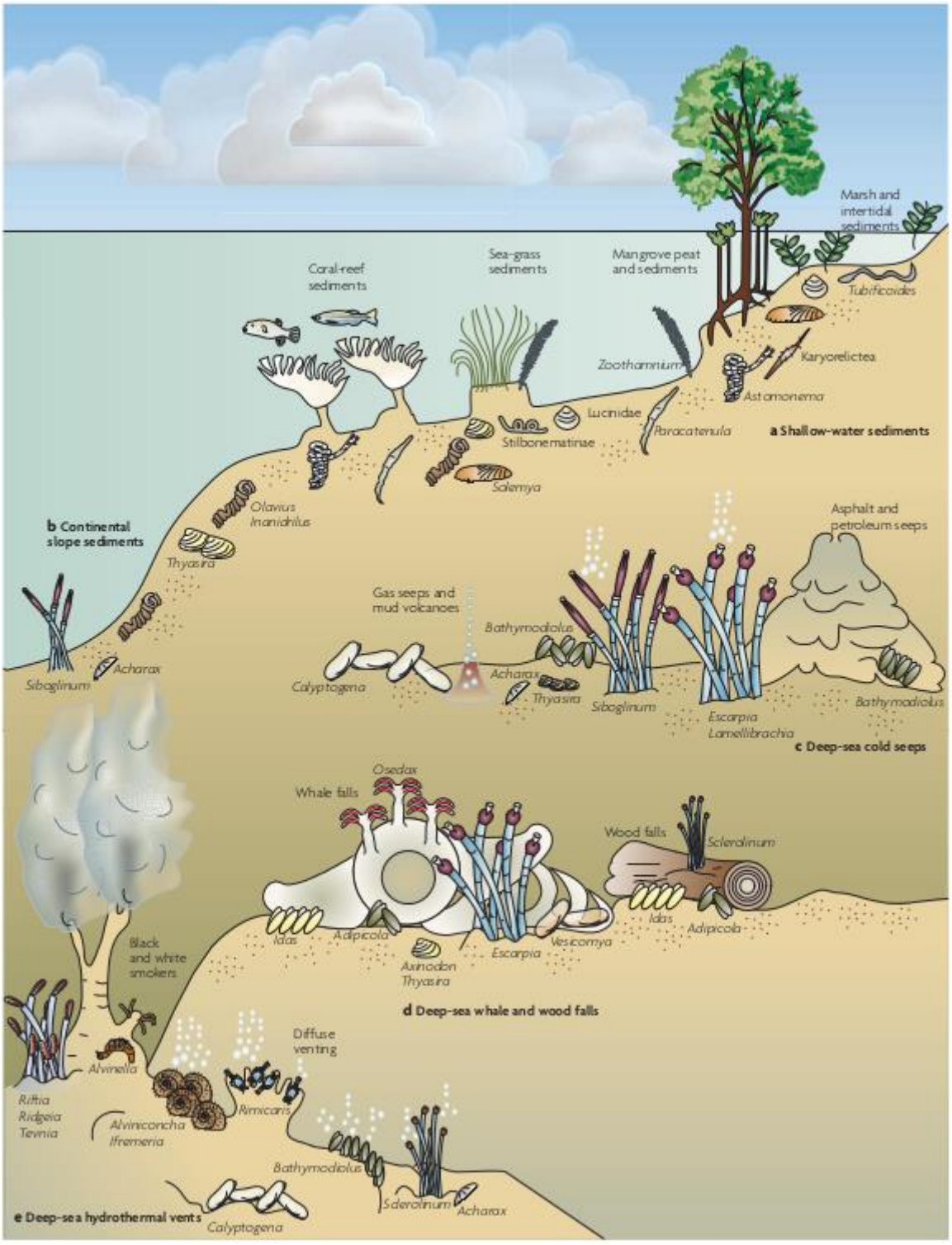


Figure 2-1 : Des exemples de symbioses chimiosynthétiques dans différents écosystèmes marins, avec de genres d'animaux qui vivent grâce aux associations symbiotiques sont énumérés à côté de chaque écosystème : a) des écosystèmes côtiers, b) des écosystèmes sur le talus continental, c) des suintements froids, d) des débris organiques (des bois coulés et des carcasses de baleines) e) des sources hydrothermales. Source : Dubilier *et al.*, 2008

2.4.1 Annélides dépourvus de tube digestif

Parmi les annélides, le groupe le plus diversifié associé à des bactéries chimiosynthétiques est celui des polychètes (Bright and Giere, 2005). Au sein de ce groupe, 4 familles comportent au moins 8 genres colonisant différents habitats à base chimiosynthétique dans l'océan profond (Bright and Giere, 2005). *Alvinella pompejana* est un ver du groupe des Terebellidae (Alvinellidae) qui colonise les sources hydrothermales de la dorsale est-Pacifique et vit en symbiose avec des épibiontes colonisant son tégument dorsal, c'est-à-dire des bactéries filamenteuses (Epsilonproteobacteria) s'attachant à la surface de ses tissus (Haddad *et al.*, 1995; Cary *et al.*, 1997). Plus spectaculaire, *Riftia pachyptila* (Figure 2-2) de la famille des Siboglinidae est un ver tubicole géant découvert à proximité des sources hydrothermales sur la même dorsale, dépourvu de système digestif et qui héberge des bactéries sulfo-oxydantes dans son trophosome – un organe spécialisé dans la culture d'endosymbiontes (Cavanaugh *et al.*, 1981; Felbeck, 1981; Jones, 1981; Rau, 1981; Bright and Giere, 2005).

Figure 2-2 : Un annélide tubicole géant *Riftia pachyptila* de la famille des Siboglinidae dans les sources hydrothermales sur la dorsale est-Pacifique. Source : Ifremer

Deux autres genres de Siboglinidae, *Lamellibrachia* et *Escarpia*, phylogénétiquement proches de *Riftia pachyptila,* accueillent aussi des symbiontes sulfoxydants (Halanych, 2005). *Lamellibrachia* et *Escarpia* colonisent les suintements froids (Sibuet and Olu, 1998), par exemple dans le golfe du Mexique (MacDonald *et al.*, 1990), la Méditerranée (Olu-Le Roy *et al.*, 2004; Duperron *et al.*, 2009a) ou encore le golfe de Guinée (Olu *et al.*, 2010; Duperron *et al.*, 2012).

Escarpia spicata (Figure 2-3) a été identifiée comme une espèce ubiquiste, car elle est trouvée autour de sources hydrothermales, de suintements froids, et elle a été observée une fois sur une carcasse de baleine dans le Bassin de Santa Catalina (Feldman *et al.*, 1998). *Sclerolinum* sp. (Monilifera) ainsi que *Siboglinum* et *Oligobrachia* spp. (Frenulata) sont d'autres représentants des polychètes qui hébergent des symbiontes sulfoxydants et qui colonisent avant tout les suintements froids et parfois les sources hydrothermales (Olu *et al.*, 1997; Sibuet and Olu, 1998; Kubota *et al.*, 2007; Thornhill *et al.*, 2008; Lösekann *et al.*, 2008). *Osedax* spp. (Rouse *et al.*, 2004) sont également des Siboglinidae dépourvus de tube digestif, mais colonisant les os des baleines (Smith *et al.*, 1989; Smith and Baco, 2003). La population des symbiontes d'*Osedax* spp. est très diverse mais comporte plutôt des bactéries Oceanospirillales spécialisées dans la dégradation du collagène et non dans la chimioautotrophie (Goffredi *et al.*, 2005, 2007; Verna *et al.*, 2010). Parmi les annélides oligochètes, *Olavius algarvensis, Olavius ilvae* et *Inandrilus* sp., des vers également dépourvus de tube digestif, vivent en symbiose avec des consortia de bactéries chimiotrophes dans un habitat oligotrophe côtier et peu profond (Dubilier *et al.*, 2001; Ott *et al.*, 2004; Ruehland *et al.*, 2008). Les débris organiques sous la forme de racines d'herbiers marins en décomposition y sont la source des sulfures.

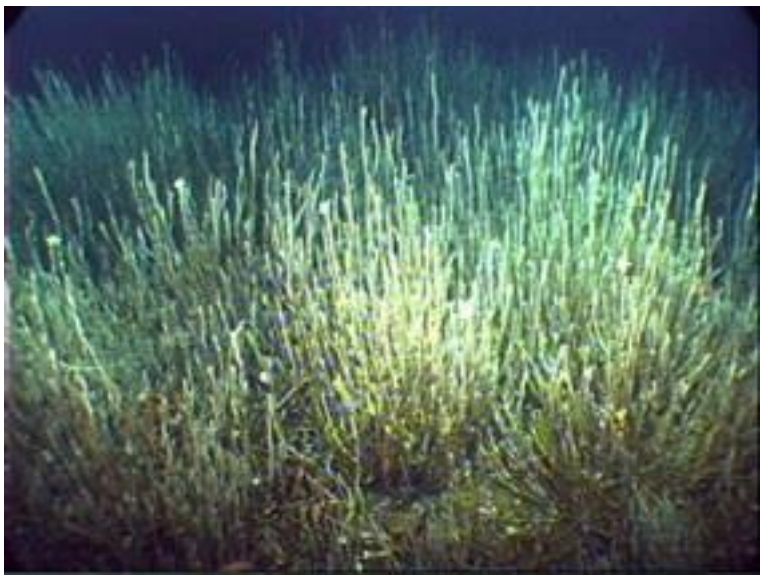


Figure 2-3 : Un annélide tubicole *Escarpia southwardae* (Siboglinidae) dans les suintements froids du golfe de Guinée. Source : Ifremer

2.4.2 Symbioses chez les arthropodes

Les arthropodes du groupe des crustacés décapodes sont souvent observés à proximité des sources hydrothermales. Les setæ sur les pattes et la partie ventrale du céphalothorax du crabe « Yeti » *Kiwa hirsuta* présent sur les cheminées de la dorsale Pacifique-Antarctique, sont couverts par des bactéries symbiotiques que les hôtes cultivent, récoltent et consomment (Goffredi *et al.*,

2008b; Thurber *et al.*, 2011). Les crevettes *Rimicaris exoculata* (Figure 2-4) dominent la faune de nombreuses sources hydrothermales de la dorsale médio-atlantique (Segonzac *et al.*, 1993). Cette crevette héberge dans sa cavité céphalothoracique une communauté bactérienne très dense, présentant une diversité morphologique, phylogénétique et métabolique importante (des bactéries oxydant les sulfures, le méthane, le fer et l'hydrogène co-existent). Malgré la présence d'un tube digestif fonctionnel, la crevette se nourrit majoritairement grâce au transfert de molécules organiques dissoutes produites par les bactéries à travers la cuticule (Ponsard *et al.*, 2013). Elles peuvent ingérer les bactéries en grattant la surface de la cheminée (Van Dover *et al.*, 1988). Elles maintiennent aussi une autre communauté de symbiontes dans leur tube digestif dont le rôle est moins connu (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003).

Figure 2-4 : Des crevettes *Rimicaris exoculata* à la surface d'une cheminée hydrothermale du site Rainbow au point remarquable « France 5 », mission BioBaz 2013. Source : Ifremer

2.4.3 Symbioses très diverses des mollusques

Parmi les divers groupes de mollusques on observe une grande diversité de symbioses qui semblent être apparues indépendamment au cours de l'évolution. Les bactéries sont présentes dans différents tissus (les branchies, le tube digestif, la glande digestive) sous la forme d'ecto- et d'endosymbiontes, et sont très diverses au niveau taxonomique (revu dans Dubilier *et al.*, 2008), d'où un grand intérêt à les étudier plus en détail.

Les patelles *Lepetodrilus fucensis* colonisent les sources hydrothermales et les suintements froids dans l'océan Pacifique et se nourrissent probablement grâce aux cultures d'ectosymbiontes à la surface de leurs branchies (Bates, 2007). Les gastéropodes *Alviniconcha hessleri* (Figure 2-5) et *Ifremeria* spp. du Pacifique occidental et de l'océan Indien possèdent également dans leurs

branchies des symbiontes intracellulaires appartenant aux Gamma- et Epsilonproteobacteria (Borowski *et al.*, 2002; Urakawa *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005b, 2005a, 2006). Les chitons (Mollusca, Polyplacophora) *Leptochiton boucheti* et *Nierstraszella lineata* qui colonisent les bois coulés, possèdent deux types d'associations symbiotiques différentes : *L. boucheti* possède des symbiontes dans son intestin et sa glande digestive, tandis que *N. lineata* entre en association avec des bactéries filamenteuses attachées à ses branchies et dont le métabolisme est probablement chimioautotrophe (Duperron *et al.*, 2013b). Chez les solenogastres (Mollusca, Aplacophora) jusqu'à quatre morphotypes différents des bactéries ont été démontrés comme accompagnant *Helicoradomenia* cf. *acredema* de la dorsale est-Pacifique (Katz *et al.*, 2006). Ces bactéries epi- et endocuticulaires, à métabolismes différents, appartiennent aux Alpha- et Gammaproteobacteria.

Figure 2-5 : Des gastéropodes *Alviniconcha hessleri* des sources hydrothermales dans le bassin de Lau méridional (sud-ouest Pacifique). Source : Ifremer

2.4.4 Bivalves

Les bivalves établissent aussi des symbioses avec diverses bactéries chimiosynthétiques. Ces bivalves symbiotiques sont représentés par des centaines d'espèces réparties dans 5 ou 6 familles dans tous les types d'habitats à base chimiosynthétique (Duperron *et al.*, 2013a). Parmi ces familles, trois sont caractérisées par le fait que tous les membres ont des symbioses (Lucinidae, Solemyidae et Vesicomyidae) tandis que la symbiose n'est pas universelle chez les Thyasiridae, et qu'elle ne concerne que le sous-groupe monophylétique des Bathymodiolinae chez les Mytilidae (revu dans Dubilier *et al.*, 2008; Duperron *et al.*, 2013a). De nombreuses espèces ont fait l'objet d'études sur les

différents aspects de la symbiose et présentent des adaptations anatomiques différentes au niveau des branchies ou du tube digestif pour accueillir les symbiontes (Roeselers and Newton, 2012). Plusieurs espèces récemment décrites appartiennent aux familles des bivalves symbiotiques, leur diversité réelle est très probablement sous-estimée et des nouvelles découvertes sont à prévoir au fur et à mesure de l'exploration détaillée de nouveaux habitats (Duperron *et al.*, 2013a). Voici quelques caractéristiques des 5 familles des bivalves symbiotiques colonisant les milieux à base chimiosynthétique.

Solemyidae

Les Solemyidae sont probablement les bivalves chez lesquels les symbioses chimiotrophes sont les plus anciennes au niveau phylogénétique (Krueger *et al.*, 1996a). Deux genres, *Solemya* et *Acharax* vivent enfouis dans les sédiments contenant des composés réduits et creusent des tunnels en forme de U ou Y pour s'assurer un accès à l'oxygène (Krueger *et al.*, 1992). Les bivalves de cette famille sont trouvés dans plusieurs régions du monde : dans les Océans Atlantique et Pacifique sur les côtes de l'Amérique (Krueger and Cavanaugh, 1997), dans les profondeurs de la Méditerranée (Rodrigues *et al.*, 2011), dans les suintements froids du golfe de Cadiz (Oliver *et al.*, 2011) et du golfe de Guinée (Duperron *et al.*, 2012), mais aussi associés aux carcasses de baleines dans l'océan Pacifique (Fujiwara *et al.*, 2007). Leurs branchies sont bien développées et contiennent des populations denses d'endosymbiontes sulfoxydants appartenant aux Gammapteobacteria (Cavanaugh, 1983), leur tube digestif est en revanche peu développé ou absent et la majorité de l'énergie est acquise grâce aux symbiontes (Krueger *et al.*, 1992). La transmission des symbiontes est probablement verticale (Cary, 1994; Krueger *et al.*, 1996b).

Thyasiridae

Les bivalves de la famille des Thyasiridae sont répandus mondialement dans différents habitats riches en hydrocarbures et sulfures (Taylor *et al.*, 2007; Rodrigues and Duperron, 2011; Keuning *et al.*, 2011). *Thyasira* spp. (Figure 2-6) ont été trouvés dans le golfe de Cadiz, la Méditerrané orientale et au Regab (Oliver *et al.*, 2011). La plupart des bivalves de cette famille sont de petite taille n'excédant pas 1 cm de longueur et vivent dans des réseaux de tunnels creusés profondément dans le sédiment (jusqu'à 30 fois plus longues que la longueur de la coquille) (Dufour and Felbeck, 2003). Cette famille n'est pas homogène, ni au point de vue morphologique, ni au point de vue physiologique : les branchies de certaines espèces sont très développées, bien adaptées à accueillir des symbiontes, tandis que chez les autres, des branchies morphologiquement simples ont été observées, où aucun symbionte n'est hébergé (Dufour, 2005). Les symbiontes des

Thyasiridae sont diversifiés au niveau phylogénétique, appartenant à au moins trois groupes de Gammaproteobacteria (Taylor *et al.*, 2007; Rodrigues and Duperron, 2011). Il a été suggéré que ce groupe des bivalves représenterait un stade précoce dans l'évolution des symbioses entre les bivalves et les bactéries chimiosynthétiques (Distel and Wood, 1992).

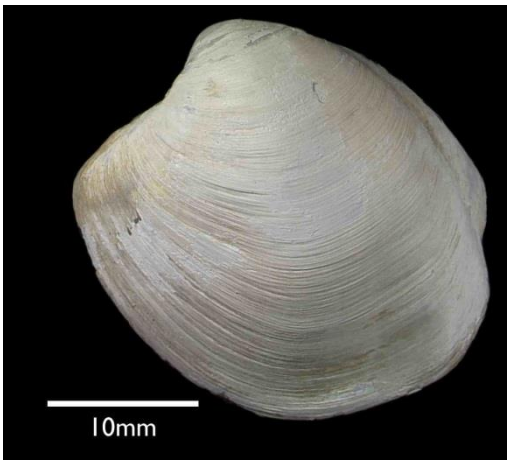


Figure 2-6 : *Thyasira vulcolutre* de volcan de boue Carlos Ribeiro (2200m de profondeur) dans le golfe de Cadiz. Source : Oliver *et al.*, 2011

Lucinidae

La famille des Lucinidae est la plus diverse et rassemble le plus grand nombre d'espèces abritant des symbiontes chimiosynthétiques autotrophes (Taylor and Glover, 2006). Généralement, les représentants de cette famille sont de petite taille – la plupart n'excède pas 10 mm de longueur (Dufour, 2005). Ils sont répartis dans toutes les zones géographiques, ils colonisent surtout les racines des herbiers marins dans la zone côtière, les sédiments, les zones d'évacuation des déchets riches en composés soufrés réduits, quelques espèces ont été trouvées dans les suintements froids, au moins une en contexte de sources hydrothermales (Taylor and Glover, 2006). Les bactéries symbiotiques sont localisées dans les vacuoles des bactériocytes situés dans la zone latérale des filaments branchiaux. Les symbiontes des Lucinidae sont phylogénétiquement proches de ceux des Thyasiridae et Solemyidae (Stewart *et al.*, 2005). Les symbiontes des espèces côtières sont aussi proches de ceux des espèces des suintements froids en Méditerranée orientale (Brissac *et al.*, 2011). La transmission des symbiontes chez *Codakia orbicularis* se fait par l'environnement et leurs formes libres ont été identifiées (Gros *et al.*, 1996). En revanche, ils ne peuvent pas être relargués des branchies (Brissac *et al.*, 2009), et semblent ne pas s'y diviser (Caro *et al.*, 2007), leur acquisition par l'environnement se faisant tout au long de leur vie (Gros *et al.*, 2012).

Vesicomyidae

Plus de 100 espèces ont été identifiées comme membres de cette famille de bivalves colonisant surtout les sédiments réduits profonds, les suintements froids, mais aussi les sources hydrothermales et les carcasses de baleines dans le monde entier (von Cosel and Olu, 2009; Krylova and Sahling, 2010). La taille de ces animaux varie de 5 mm (*Isorropodon* spp., Figure 2-7) jusqu'à 280 mm (*Calyptogena* spp.). Ils vivent souvent à demi enfouis dans le sédiment. Les clams de cette famille se nourrissent grâce à leur endosymbiontes sulfoxydants, leur tube digestif étant peu développé (Cavanaugh, 1983). Les symbiontes sont nombreux dans les bactériocytes des branchies et sont phylogénétiquement très proches de ceux de *Bathymodiolus*, à tel point qu'il est possible qu'ils soient des descendants de ces symbiontes qui auraient changé d'hôte (Cavanaugh *et al.*, 2006). Les symbiontes ont été détectés dans les gonades (Endow and Ohta, 1990; Cary and Giovannoni, 1993; Krueger *et al.*, 1996b) ce qui se traduit par une co-spéciation de l'hôte et du symbionte et une réduction de la taille du génome de ce dernier, qui semble ne pas pouvoir vivre en dehors de son hôte (Peek *et al.*, 1998b). Les génomes réduits des symbiontes séquencés chez deux espèces de *Calyptogena* sont les premiers génomes des symbiontes chimiotrophes séquencés, et parmi les plus petits connus pour une bactérie autotrophe (Kuwahara *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2007).

Figure 2-7 : *Isorropodon perplexum* provenant du volcan de boue Captain Arutyunov (1300m de profondeur) dans le golfe de Cadiz. Source : Oliver *et al.*, 2011

Mytilidae

Les moules de cette famille sont surtout connues dans les zones de balancement des marées, et comme des espèces d'intérêt commercial. Mais les Mytilidae comprennent une sous famille dont les membres ont colonisé les fonds marins et développé des symbioses. Ces Bathymodiolinae (incluant une partie des Modiolinae) sont considérés comme des animaux qui ont remporté un vif

succès évolutif dans la colonisation des milieux à base chimiosynthétique (Distel *et al.*, 2000; Duperron, 2010; Lorion *et al.*, 2010, 2013). Ils ont été échantillonnés autour des sources hydrothermales, des suintements froids, des carcasses de baleines et des bois coulés (Duperron, 2010; Duperron *et al.*, 2013a). Au niveau des sources hydrothermales, les moules vivent attachées aux bases des cheminées par leur byssus (Le Bris and Duperron, 2010). Dans d'autres habitats, les moules s'attachent aux carbonates ou autres substrats durs, parfois aux tubes des vestimentifères (Olu-Le Roy *et al.*, 2007b). Deux genres, *Bathymodiolus* et *Idas* (Figure 2-8) sont les mieux connus dans cette famille. Les moules du genre *Bathymodiolus*, dont les adultes peuvent atteindre 36 cm de longueur (le cas de *B. boomerang*), dominent par exemple la faune colonisant les fumeurs sur la dorsale médio-atlantique ou encore divers sites de suintements froids (Von Cosel *et al.*, 1999; Desbruyères *et al.*, 2000). Les moules du genre *Idas* sont un exemple de polyvalence et d'adaptation aux différents types d'écosystèmes à base chimiosynthétique (Duperron *et al.*, 2008b; Lorion *et al.*, 2009, 2012; Gaudron *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2013; Bienhold *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2013b). Jusqu'à maintenant, toutes les espèces de Bathymodiolinae répertoriées vivent en symbiose avec 1 à 6 phylotypes différents de bactéries chimiosynthétiques localisées dans les bactériocytes de leur branchies (Duperron *et al.*, 2008b; Duperron, 2010). Le plus souvent ce sont des bactéries sulfo-oxydantes, plus rarement méthanotrophes (Cavanaugh, 1983; Childress *et al.*, 1986; Cavanaugh *et al.*, 1987). Dans le cas de *B. azoricus, B. puteoserpentis, B. boomerang, B. brooksi* et *B. heckerae* les deux phylotypes cohabitent dans un même bactériocyte (Fisher *et al.*, 1993; Distel *et al.*, 1995; Duperron *et al.*, 2005, 2006). Jusqu'à 6 phylotypes différents ont été identifés chez *Idas modiolaeformis* (Duperron *et al.*, 2008b; Lorion *et al.*, 2012). La transmission des symbiontes est le plus probablement horizontale et passe par l'environnement (Won *et al.*, 2003; Gaudron *et al.*, 2012).

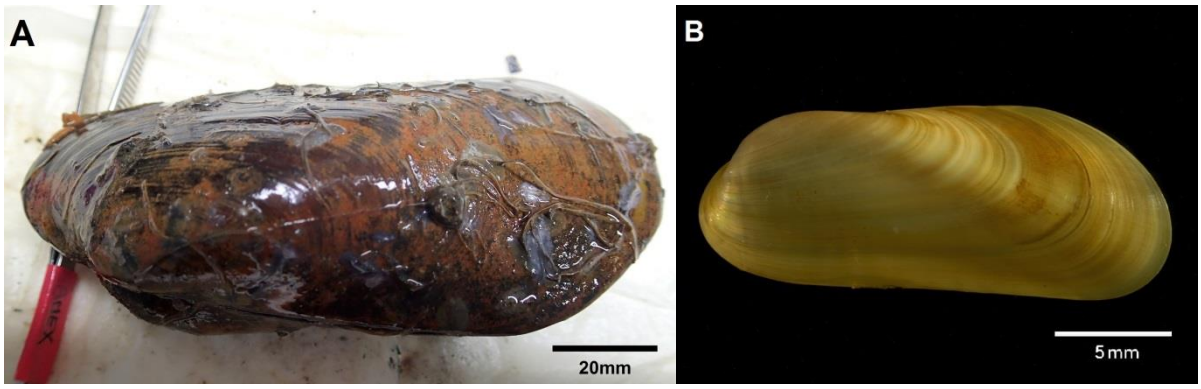


Figure 2-8 : A : Une moule *Bathymodiolus puteoserpentis* du site Snake Pit (3500 m de profondeur) sur la dorsale médio-atlantique, campagne BICOSE en août 2014 (photo Kamil Szafranski) ; B : Une moule *Idas simpsoni* du Canyon Lacaze-Duthiers (520 m de profondeur) dans la Méditerranée ouest (photo Sven Laming).

2.5 Diversité des symbiontes chimiosynthétiques

Les associations entre les métazoaires et les bactéries chimiosynthétiques dans les milieux marins profonds présentent une grande diversité. Au cours de l'évolution, les symbioses chimiosynthétiques sont probablement apparues plusieurs fois et de manière indépendante. Ceci implique l'existence d'une multitude de mécanismes de coopération entre les animaux concernés et leurs symbiontes. Dans le paragraphe précédent, les principaux groupes de métazoaires chimiosymbiotiques ont été caractérisés brièvement. Le but de cette partie est de décrire les bactéries symbiotiques et les associations elles-mêmes. Plusieurs critères doivent être considérés : la localisation des bactéries par rapport aux cellules et organes de l'hôte, leur diversité taxonomique, mais aussi leur métabolisme. L'ensemble de ces critères permet de créer « un portrait » d'un symbionte et de mieux comprendre le mécanisme de son association avec l'animal.

2.5.1 Localisation des bactéries

Les symbiontes qui colonisent la surface du corps de leur hôte sont appelés les épibiontes, tandis que les endobiontes vivent à l'intérieur du corps de leur hôte. La localisation intra- ou extracellulaire des bactéries dans les différentes parties du corps de l'animal reflète la « profondeur » et la flexibilité de l'association (Dubilier *et al.*, 2008). A ce niveau, on distingue les endosymbiontes qui s'installent à l'intérieur des cellules des hôtes, et les ectosymbiontes qui sont présents en déhors des cellules de l'animal. Chez le crevettes *Rimicaris exoculata*, présentes sur la dorsale médio-atlantique (Segonzac *et al.*, 1993), les ectosymbiontes couvrent la face interne de la carapace et les pièces buccales, notamment les scaphognathites, hypertrophiés et recouverts de soies bactériophores (Gebruk *et al.*, 1993; Zbinden *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2010). *Alvinella pompejana*, présente sur la dorsale est-Pacifique est un autre exemple, et vit en symbiose avec des ectosymbiontes colonisant son tégument dorsal (Haddad *et al.*, 1995; Cary *et al.*, 1997). Les ectosymbiontes peuvent couvrir presque toute la surface de leur hôte comme dans le cas du crabe hydrothermal *Kiwa hirsuta* (Goffredi *et al.*, 2008a). Dans le cas des symbioses chez les bivalves, les ectosymbioses sont en général considérées comme les associations les plus primitives, ou moins intégrées (Dufour, 2005).

Les endobiontes colonisent les cavités internes du corps de l'hôte, mais ils peuvent être localisés à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules (Figure 2-9). Presque tous les symbiontes des bivalves de la famille des Thyasiridae sont des ectosymbiontes extracellulaires (Dufour, 2005). Chez ces bivalves, les bactéries vivent dans les filaments branchiaux, entre les microvillosités des bactériocytes, mais elles restent en dehors des cellules de l'hôte, quoique la question reste encore à

débattre (Dufour, 2005). Chez certains Mytilidae, notamment chez *Idas* spp., les symbiontes sulfo-oxydants sont aussi extracellulaires, localisés à la surface des cellules de l'épithélium branchial (Duperron *et al.*, 2009b). *Maorithyas hadalis* est la seule exception connue chez les Thyasiridae, qui porte ses endosymbiontes à l'intérieur des bactériocytes dans ses branchies (Dufour, 2005). La même localisation intracellulaire dans les cellules de l'épithelium branchial hypertrophié est observée chez les moules du genre *Bathymodiolus* et chez toutes les espèces de Vesicomyidae, Lucinidae et Solemyidae (Duperron *et al.*, 2013a). Les gastéropodes tels qu'*Ifremeria nautilei* et *Alvinichonca hessleri* possèdent dans leur branchies des symbiontes intracellulaires sulfoxydants ou méthanotrophes (Borowski *et al.*, 2002; Urakawa *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005b, 2005a, 2006). Chez les annélides polychètes, le niveau d'intégration hôte – symbionte est encore plus avancé car un organe spécialisé – le trophosome – remplace les fonctions du tube digestif (Cavanaugh *et al.*, 1981). Les endosymbiontes sulfo-oxydants y sont cultivés, l'hôte leur assurant l'apport de tous les composants nécessaires à la chimiosynthèse (Bright and Giere, 2005), notamment les sulfures, le carbone inorganique, et l'oxygène, grâce en particulier à une hémoglobine unique et spécialisée (Flores *et al.*, 2005).

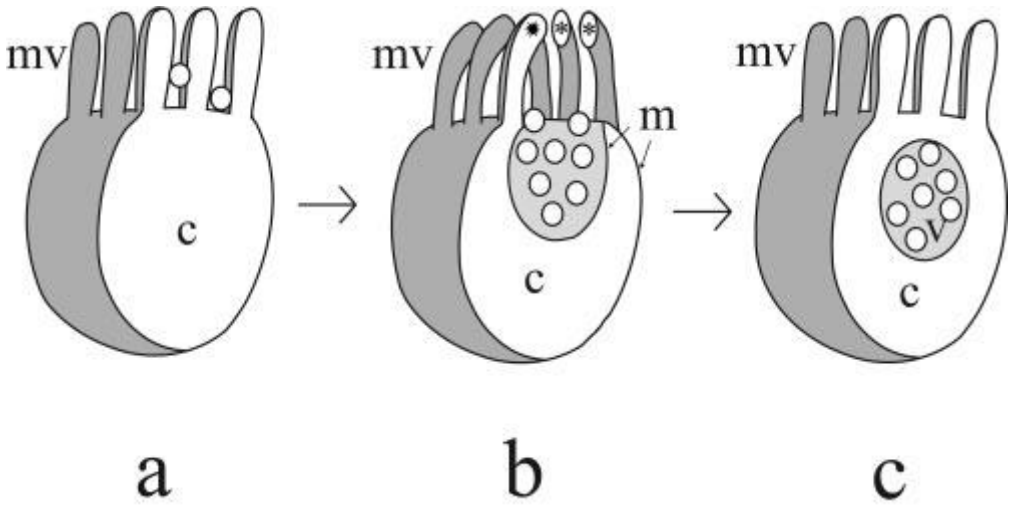


Figure 2-9 : Diagramme présentant l'évolution de l'association symbiotique entre les bactéries et les bivalves de la famille des Thyasiridae : a) les symbiontes extracellulaires (ectosymbiontes) localisés entre les microvillosités des bactériocytes, b) les symbiontes extracellulaires (ectosymbiontes) insérés dans l'espace entre la membrane cellulaire (m) et les micovillosités (mv), c) les symbiontes intracellulaires (endosymbiontes), enfermés dans le vacuole (v). Source : Dufour, 2005

2.5.2 Diversité taxonomique des bactéries symbiotiques chimiosynthétiques

La majorité des symbiontes sulfo-oxydants appartient aux Gammaproteobacteria. Ils sont classés dans au moins 9 clades distincts qui contiennent aussi les formes libres des bactéries sulfo-oxydantes (Dubilier *et al.*, 2008). Ceci suggère que les symbioses sulfo-oxydantes se sont

développées indépendamment et à des moments différents dans l'histoire évolutive des bactéries (Dubilier *et al.*, 2008). Les Gammaproteobacteria sont les symbiontes majoritaires chez toutes les familles de bivalves symbiotiques (Figure 2-10) (Duperron, 2010; Duperron *et al.*, 2013a), chez les gastéropodes (Urakawa *et al.*, 2005), chez les polychètes siboglinidés (Bright and Giere, 2005) et chez les oligochètes (Ruehland *et al.*, 2008). Les Epsilonproteobacteria constituent l'autre groupe abondant qu'on trouve souvent en associations avec la faune de milieux à base chimiosynthétique. Ces bactéries sont majoritaires parmi les ectosymbiontes d'arthropodes tels que les crevettes *Rimicaris exoculata* (Polz and Cavanaugh, 1995), ainsi que chez *Alvinella pompejana* (Haddad *et al.*, 1995; Cary *et al.*, 1997). Quelques phylotypes d'Epsilonproteobacteria en parallèle des Gammaproteobacteria ont été identifiés chez les Siboglinidae (Duperron *et al.*, 2009a). Ces deux types de symbiontes ont également été identifiés chez *Alviniconcha hessleri* (Suzuki *et al.*, 2005b, 2005a). L'autre gastéropode *Ifremeria nautilei* vit en symbiose avec des Alpha- et des Gammaproteobacteria (Borowski *et al.*, 2002). Un mélange d'Epsilon- et de Gammaproteobacteria ainsi que de Bacteroidetes a été trouvé parmi les épibiontes du crabe *Kiwa hirsuta* (Goffredi *et al.*, 2008a). Chez les chitons, les Mollicutes (probablement hétérotrophes) sont abondantes dans l'intestin de *Leptochiton boucheti* tandis que les Deltaproteobacteria dominent dans les branchies de *Nierstraszella lineata* (Duperron *et al.*, 2013b). Les analyses moléculaires des symbiontes ont permis de révéler leur diversité phylogénétique. Celle-ci se double probablement d'une grande diversité métabolique, et donc la mise en évidence du métabolisme des symbiontes est nécessaire pour caractériser une symbiose bactérienne chimiotrophe.

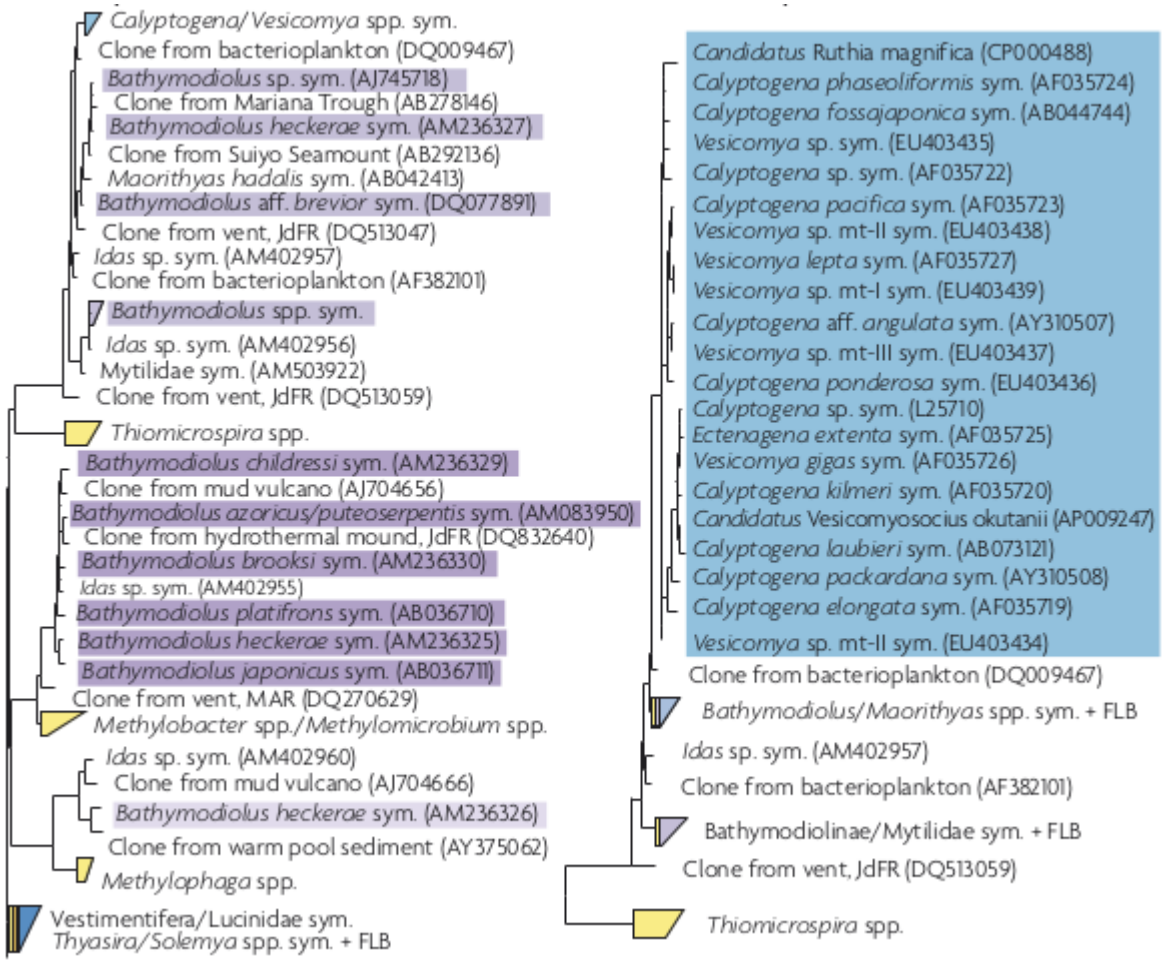


Figure 2-10 : Un exemple des relations phylogénétiques entre les symbiontes de deux familles de bivalves (Bathymodiolinae sur l'arbre de gauche et Vesicomyidae sur l'arbre de droite). Les arbres phylogénétiques des symbiontes ont été construits sur la base des séquences 16S de l'ARNr. Les symbiontes du même groupe que les hôtes sont marqués de la même couleur, tandis que les bactéries libres sont en jaune. Source : Dubilier *et al.*, 2008

2.5.3 Les métabolismes des symbiontes

La chimiosynthèse s'appuie sur l'acquisition d'énergie par des réactions d'oxydo-réduction de composés chimiques. En fonction de la source d'énergie, les organismes chimiotrophes peuvent être : des chimiolithotrophes utilisant des composés inorganiques (H_2S, H_2) ou des chimioorganotrophes utilisant des molécules organiques (CH_4, souvent d'origine organique). Les bactéries qui utilisent l'énergie contenue dans des molécules inorganiques et sans utiliser la lumière du soleil pour fixer le carbone inorganique sont appelées des chimioautotrophes. Jusqu'à présent, les symbiontes des métazoaires des milieux à base chimiosynthétique ne sont pas cultivables en laboratoire. La quantité de matériel biologique, ainsi que le spectre des méthodes d'analyses disponibles restent donc limités. Le métabolisme d'un symbionte est donc le plus souvent déduit à partir de l'analyse des activités enzymatiques, des mesures d'isotopes stables, de l'ultrastructure des bactéries, et plus récemment du contenu des génomes et des protéomes.

La chimiosynthèse a été suggérée pour la première fois comme un mode de nutrition chez le ver *Riftia pachyptila* (Felbeck, 1981). Ce rôle a été attribué ensuite aux bactéries symbiotiques des invertébrés des milieux riches en sulfures (Cavanaugh, 1983). Les symbiontes sulfo-oxydants oxydent les composés chimiques réduits, comme le sulfure d'hydrogène (H_2S), le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$), le soufre élémentaire (S^0) ou l'hydrogène (H_2) qui sont des donneurs d'électrons. Pour cela, ils utilisent des accepteurs d'électrons comme l'oxygène (O_2) et parfois des nitrates (NO_3^-). L'oxydation des sulfures comporte plusieurs étapes et deux enzymes en sont responsables : la sulfite oxydase et l'adénosine phosphosulfate réductase (APS). Les bactéries méthanotrophes sont quant à elles, capables de se développer en utilisant le méthane à la fois comme source d'énergie et source de carbone. Les méthane mono-oxygénases (MMO) membranaire et particulaire participent à l'oxydation du méthane en méthanol, qui est le premier substrat d'assimilation du carbone dans cette voie métabolique (Hanson and Hanson, 1996). Les bactéries méthanotrophes ont été identifiées entre autres, en tant que symbiontes chez les moules du genre *Bathymodiolus* vivant dans un habitat riche en hydrocarbures dans le golfe du Mexique (Childress *et al.*, 1986). Récemment, il a été montré aussi que les symbiontes sulfo-oxydants des moules *Bathymodiolus* étaient capables de métaboliser le dihydrogène à l'aide d'hydrogénases et de l'utiliser comme une source d'énergie (Petersen *et al.*, 2011). Les auteurs ont également mis en évidence cette possibilité chez *R. pachyptila* et *Rimicaris exoculata*. En 2004, Zbinden et co-auteurs ont suggéré la présence des bactéries oxydant le fer réduit dans la cavité branchiale chez les crevettes *R. exoculata* du site Rainbow dont les fluides sont riches en H_2, Fe^{2+} et CH_4. Ce sont des bactéries capables de déposer des oxydes de fer dans ou sur des capsules ou du matériel muqueux extra-cellulaire excrété par ces bactéries. Il y a très peu d'informations sur le métabolisme de l'azote, mais les symbiontes des moules *Bathymodiolus* ou des clams *Calyptogena* du golfe du Mexique peuvent potentiellement fixer l'azote inorganique en parallèle du carbone (Lee *et al.*, 1992, 1999; Becker *et al.*, 2010).

L'énergie issue de l'oxydation est ensuite utilisée par les bactéries pour synthétiser toutes les molécules organiques à partir du dioxyde de carbone gazeux (CO_2 en équilibre des pressions partielles dans l'eau et l'air) ou dissous dans l'eau (HCO_3^- en équilibre dans l'eau avec le CO2 dissous et avec les ions carbonates) et pour nourrir leurs hôtes. Initialement, il a été montré que le carbone inorganique était fixé au cours du cycle de Calvin-Benson par l'intermédiaire de l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCO), similaire à celle rencontrée chez les organismes photosynthétiques (Fiala-Médioni *et al.*, 1986; Cavanaugh *et al.*, 1988). Actuellement, parmi plusieurs façons de fixer le CO_2, deux voies métaboliques sont considérées comme importantes dans les symbioses de l'océan profond : le cycle de Calvin-Benson (cycle CBB) et le cycle de Krebs inversé (cycle rTCA, reverse Tri-Carboxylic Acid cycle) (Elsaied and Naganuma, 2001; Campbell

and Cary, 2004; Campbell *et al.*, 2006). Ce dernier est une voie métabolique cyclique reprenant le cycle de Krebs en sens inverse où le coût énergétique de fixation de CO_2 est moins élevé qu'au cours du cycle de Calvin-Benson. Le cycle rTCA est utilisé par les Epsilonproteobacteria, tandis que le CBB est commun chez les Alpha- et Gammaproteobacteria (Takai *et al.*, 2005). Récemment, il a été démontré par une approche métagénomique que le symbiote de *Riftia pachyptila* utilisait le cycle de Krebs inversé parallèlement au cycle de Calvin-Benson pour fixer le CO_2 (Markert *et al.*, 2007). Les enzymes clés de ces deux voies métaboliques, l'ATP citrate lyase (ACL) et la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCO) sont souvent utilisées pour les prédictions du métabolisme des symbiontes (Petersen and Dubilier, 2009). La RuBisCO existe sous plusieurs formes : forme IA chez les symbiontes des moules Bathymodiolinae, et la forme II chez ceux des Vesicomyidae (Kleiner *et al.*, 2012). A ce niveau-là il y a des incongruences dans les phylogénies des Gammaproteo-symbiontes basées sur les séquences de l'ARNr 16S et celles de la RuBisCO. Kleiner et collaborateurs (2012) les expliquent par le transfert horizontal des gènes grâce auquel certaines voies métaboliques semblent avoir été transférées entre lignées de symbiontes.

Les symbiontes sulfo-oxydants sont communs chez les Mollusques, Annélides et les Arthropodes (Dubilier *et al.*, 2008). Chez les bivalves, on les trouve chez les membres des 5 familles « chimiosymbiotiques » (Cavanaugh *et al.*, 2006; Duperron, 2010; Roeselers and Newton, 2012; Duperron *et al.*, 2013a). Leur abondance dans les tissus des bivalves des Thyasiridae, Lucinidae et Mytilidae, paraît être liée à la disponibilité des sulfures dans l'environnement (Kádár *et al.*, 2005; Dufour and Felbeck, 2006; Riou *et al.*, 2008). L'oxydation du soufre est une capacité fréquente chez de nombreuses bactéries des divisions Gamma et Epsilonproteobacteria qui s'associent en symbiose et chez les formes libres qui leur sont apparentées (Dubilier *et al.*, 2008). Il s'agit d'un type de symbiose ubiquiste du point de vue métabolique. Sur le plan évolutif, les symbiontes appartiennent aux différents taxons.

Contrairement aux symbioses sulfo-oxydantes, les symbioses exclusivement méthanotrophes sont plus rares. Parmi les animaux qui accueillent ce type de symbiontes il y a des moules *Bathymodiolus childressi* (Childress *et al.*, 1986), *B. platifrons* et *B. japonicus* (Fujiwara *et al.*, 2000). Les symbioses doubles (ou multiples) où les deux types des symbiontes co-existent (Figure 2-11), sont beaucoup plus fréquentes que celles avec des bactéries méthanotrophes seules. Cette co-existence de deux types de bactéries a été observée au microscope électronique chez *B. brooksi* du golfe du Mexique (Fisher *et al.*, 1993). Une symbiose double a été documentée pour la première fois en 1995, par FISH et séquençage du gène de l'ARNr 16S chez la moule *B. puteoserpentis* de la dorsale médio-atlantique (Distel *et al.*, 1995).

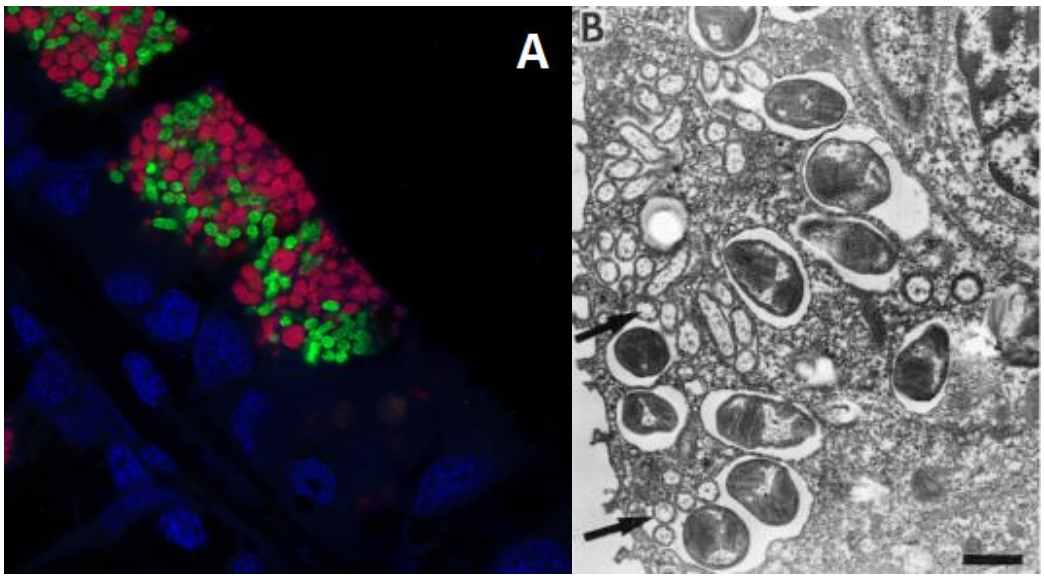


Figure 2-11 : A: photo au microscope confocal de bactéries symbiotiques dans les filaments branchiaux de *Bathymodiolus azoricus*. Section transversale avec les bactéries sulfo-oxydantes colorées en rouge et les méthanotrophes en vert (photo Kamil Szafranski et Bérénice Piquet) ; B : Photo au microscope électronique à transmission de bactéries sulfo-oxydantes (flèches noires) et méthanotrophes dans les mêmes vacuoles des bactériocytes de *Bathymodiolus azoricus*. Source : Fiala-Medioni *et al.*, 2002

2.5.4 Avantages et inconvénients des symbioses multiples

Au cours des dernières années, les symbioses multiples ont été de plus en plus souvent mises en évidence grâce à l'apport de la biologie moléculaire, notamment dans le cas de *B. azoricus, B. puteoserpentis* ou *B. brooksi* où les bactéries sulfo-oxydantes et méthanotrophes cohabitent dans un seul bactériocyte (Fisher *et al.*, 1993; Distel *et al.*, 1995; Duperron *et al.*, 2005, 2006). Chez *B. heckerae* 4 symbiontes coexistent : deux sulfoxydants, un méthanotrophe et un méthylotrophe (Duperron *et al.*, 2007) et jusqu'à 6 phylotypes différents ont été identifiés chez *Idas modiolaeformis* (Duperron *et al.*, 2008b). Un autre exemple est celui du gastéropode *Ifremeria nautilei* qui porte dans ses branchies deux symbiontes intracellulaires, une Alpha- et une Gammaproteobacteria (Borowski *et al.*, 2002). Les Gammaproteobacteria sulfo-oxydantes sont nombreuses, tandis que les Alphaproteobacteria méthanotrophes sont peu abondantes et n'avaient pas été détectées lors des études antérieures (Borowski *et al.*, 2002). Avec le développement de techniques de détection plus sensibles, les questions sur les symbioses multiples seront de nouveau posées. Les symbioses doubles ou multiples assurent la flexibilité des hôtes en leur permettant de mieux exploiter les ressources disponibles dans leur habitat. Ceci a été montré au cours d'expériences sur les moules *B. azoricus* du site Menez Gwen sur la dorsale médio-atlantique. Les moules maintenues au laboratoire ont été soumises à des concentrations différentes de sulfures et/ou de méthane et les abondances relatives des symbiontes changeaient en fonction du substrat

disponible (Kádár *et al.*, 2005; Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008). La coexistence de symbiontes pose la question de leur cohabitation, entre collaboration et compétition. Des phénomènes de syntrophie, où l'un de partenaires dépend (partiellement ou entièrement) des composés chimiques produits par l'autre, ont été démontrés par exemple chez les oligochètes (Woyke *et al.*, 2006), tandis que les symbiontes méthylotrophes de *B. heckerae* sont suspectés métaboliser le méthanol produit par les symbiontes méthanotrophes (Duperron *et al.*, 2007).

La co-existence de deux phylotypes de symbiontes intracellulaires proches, telle qu'elle a été déjà montrée à l'aide du pyroséquençage chez un clam *Vesicomya* sp. de la dorsale Juan de Fuca (Stewart and Cavanaugh, 2009), pose également la question de la compétition entre lignées de symbiontes et de leur éventuel remplacement au cours de l'évolution. Récemment, il a été suggéré que la proximité physique de deux espèces de clams sur des sites de suintements froids dans le golfe de Guinée, pouvait promouvoir l'échange de symbiontes différents, car une lignée « étrangère » de bactéries symbiotiques apparaissait occasionnellement chez *Christineconcha regab* et *Laubiericoncha chuni*, deux Vesicomyidae (Decker *et al.*, 2013). Dans ces cas-là, les symbioses doubles donnent une rare opportunité d'échange du matériel génétique entre les deux symbiontes, ce qui est de grande importance notamment dans le cas des symbiontes transmis verticalement (Stewart *et al.*, 2009).

Finalement, dans le cas des symbioses multiples, des différences importantes de proportion entre les deux types de symbiontes sont souvent observés. Ceci peut suggérer la facilité d'établir des nouvelles associations ou de modifier celles déjà établies pour mieux s'adapter à l'environnement. Les symbiontes identifiés jusqu'à maintenant sont proches des bactéries chimiosynthétiques libres au niveau phylogénétique et métabolique (Dubilier *et al.*, 2008). Une question que l'on se pose actuellement est « comment une bactérie libre devient-elle un symbionte ? ».

3. Cycles de vie des symbiontes

La reproduction est une étape importante dans les cycles de vie des organismes et différentes stratégies ont été élaborées au cours de l'évolution. Ceci est vrai pour tous les êtres vivants, mais dans un grand nombre de cas, il ne s'agit pas seulement d'une simple multiplication « sur place », car une niche écologique occupée par un organisme peut un jour lui devenir hostile, suite à des changements environnementaux. Dans ce cas-là une longévité d'espèce peut être maintenue grâce à la colonisation de nouvelles niches écologiques. Au cours du cycle de vie, les organismes lors d'une phase dispersive (larvaire souvent chez les métazoaires marins) ont une possibilité de coloniser d'autres niches écologiques, habitats ou environnements. Un autre point central dans le cycle de vie de ces organismes est la nécessité de développer des stratégies de dispersion. Plusieurs voies sont possibles : la production massive de gamètes, puis l'adaptation morphologique des larves ou juvéniles pour faciliter la dispersion (larves plancto- ou lécithotrophes), ou encore la mise en place de mécanismes de résistance aux conditions néfastes comme dans le cas des spores de bactéries ou de champignons. Pour étudier le cycle de vie d'un organisme il faut donc caractériser sa niche écologique et comprendre les mécanismes de dispersion. Il est nécessaire d'étudier les différentes étapes de son cycle de vie pour comprendre les raisons et les conséquences évolutives d'une stratégie donnée.

Les milieux à base chimiosynthétique, où une grande fraction des métazoaires vit grâce aux associations symbiotiques avec des bactéries chimiotrophes, sont des habitats éphémères et disséminés sur de grandes distances (voir avant-propos). Du point de vue des organismes colonisant ces habitats, les stratégies de reproduction et de dispersion semblent conditionnées par cette distribution géographique non-homogène des sites. Ils doivent faire le plus grand effort possible pour échanger du matériel génétique lors de la réproduction. La reproduction sexuée permet non seulement l'échange de matériel génétique entre les individus d'une même espèce appartenant ou non à une même population mais permet aussi d'éliminer les allèles délétères. Un certain nombre d'espèces animales savent coloniser un large spectre de milieux à base chimiosynthétique, que ce soit au plan géographique ou du type d'habitat (voir chapitre 2), mais la plupart des espèces sont cantonnées à une région ou un type d'habitat. Les questions sur les cycles de vie respectifs des hôtes et de leurs symbiontes dans l'océan profond sont centrales. La question du rôle de la symbiose est un sujet du débat

scientifique actuel, tandis que les symbiontes eux-mêmes sont toujours peu connus. Dans ce paragraphe, les connaissances actuelles concernant ces cycles de vie, notamment le mode de transmission des symbiontes d'une génération à l'autre, la dispersion et la connectivité des partenaires sont présentées.

3.1 Modes de transmission des symbiontes

La transmission des bactéries symbiotiques est responsable du renouvellement de la symbiose dans les générations successives de l'hôte. Deux modes de transmission se distinguent : la transmission horizontale où les bactéries sont acquises par l'environnement qui est un réservoir de formes libres ou de bactéries libérées par d'autres hôtes, et la transmission verticale où les symbiontes sont transmis dans la lignée maternelle (ou plus rarement à partir des gamètes mâles ou des deux parents) (Bright and Bulgheresi, 2010). Le changement occasionnel du type de transmission est possible, c'est la transmission mixte, où les bactéries à transmission *a priori* maternelle peuvent avoir un passage transitoire dans l'environnement pour coloniser un autre hôte de la même espèce ou famille (Stewart *et al.*, 2008; Stewart and Cavanaugh, 2009; Decker *et al.*, 2013). La voie de transmission joue un rôle crucial dans l'évolution de tous les partenaires de la symbiose (Yamamura, 1996; Bright and Bulgheresi, 2010). Le schéma illustrant des différents modes de transmission des symbiontes est présenté sur la Figure 3-1.

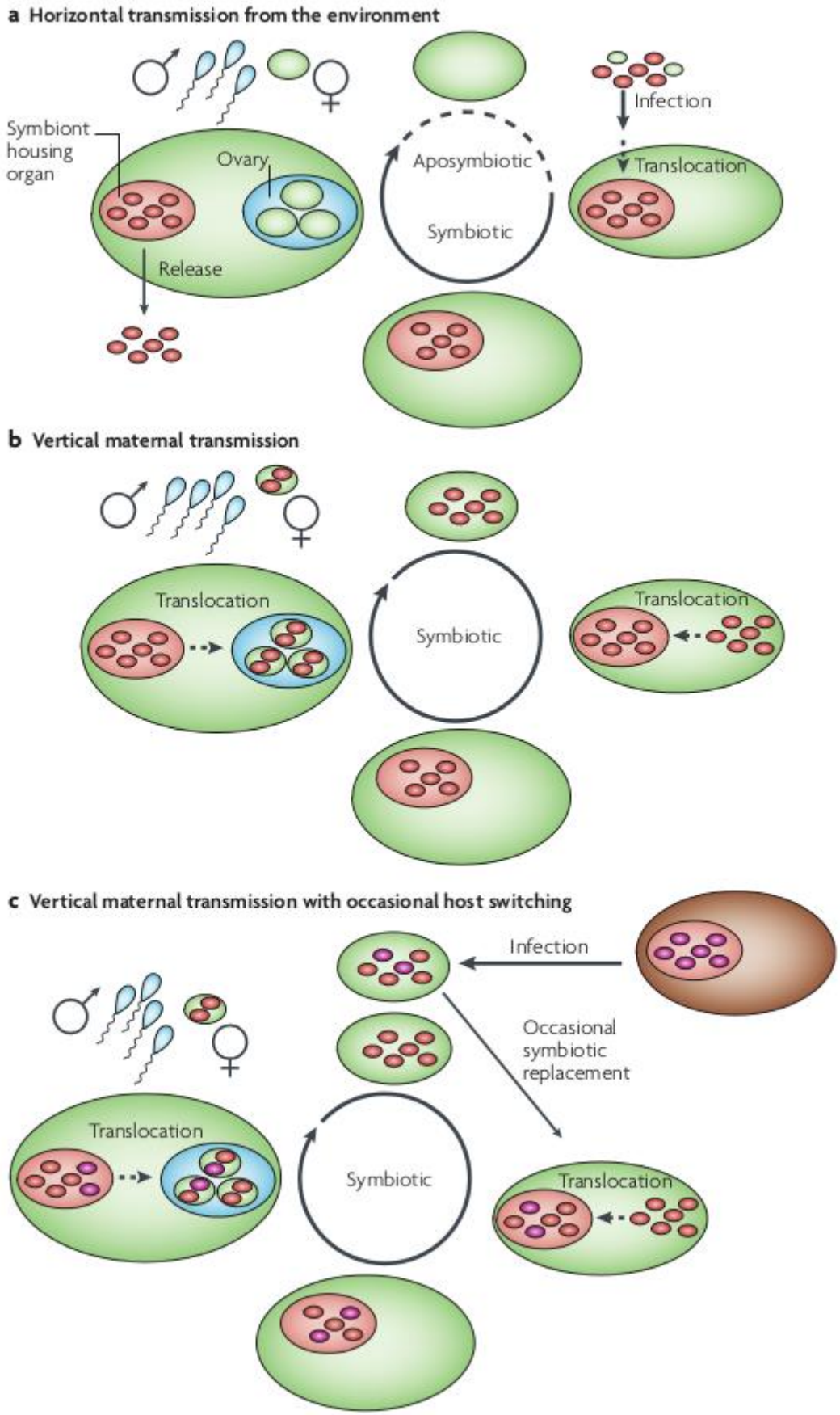


Figure 3-1 : Les voies de la transmission des bactéries symbiotiques : a) horizontale; b) verticale; c) mixte. Source : Bright and Bulgheresi, 2010

3.1.1 Transmission horizontale

Le cycle de vie d'un animal dont les symbiontes sont transmis de manière horizontale consiste en des alternances de phases : symbiotique où l'animal est associé aux bactéries et asymbiotique (ou aposymbiotique) où il en est dépourvu. Ce dernier stade peut comporter les gamètes, les embryons et les stades larvaires et post-larvaires jusqu'au moment de l'infection par les formes libres des bactéries symbiotiques (Figure 3-1a). Dans les environnements à base chimiosynthétique, ce type de transmission des symbioses a été documenté en détail chez *Riftia pachyptila* un annélide de la famille des Siboglinidae (Nussbaumer *et al.*, 2006) et chez le bivalve *Codakia orbicularis* de la famille des Lucinidae (Gros *et al.*, 1996). Ce type de transmission a été suggéré par ailleurs par des études génétiques chez les moules Bathymodiolinae (Won *et al.*, 2003, 2008), et confirmé par l'absence des symbiontes dans les ovocytes des moules *Idas modiolaeformis* (Gaudron *et al.*, 2012).

Les formes libres ont été identifiées pour les symbiontes de *R. pachyptila* dans les sources hydrothermales (Harmer *et al.*, 2008), *Oligobrachia mashikoi* de la Baie de Tsukumo à une profondeur de seulement 25 m (Aida *et al.*, 2008) et de *C. orbicularis* dans les herbiers côtiers (Gros *et al.*, 2003). Des expériences d'infection des juvéniles par les bactéries symbiotiques du sédiment non-stérile ont été effectuées chez ce dernier par Gros et collaborateurs (1996). L'infection des branchies chez les juvéniles de *C. orbicularis* a eu lieu deux jours après l'ajout du sédiment « contaminé », par endocytose, ce qui a déclenché la transformation des cellules des filament branchiaux en bactériocytes (Gros *et al.*, 1998). La ré-acquisition des bactéries chimiosynthétiques paraît ne plus être possible chez les bivalves *Loripes lacteus* (Lucinidae) adultes (Espinosa *et al.*, 2013). Chez les moules *B. azoricus* du site Menez Gwen (à 860 m de profondeur) la perte totale de symbiontes a été observée au laboratoire après un mois de carence en sulfures, suivie par leur ré-acquisition de l'environnement, quand le substrat de leur métabolisme était ajouté de nouveau dans l'eau (Kádár *et al.*, 2005). Cette perte des bactéries symbiotiques se fait probablement par digestion intracellulaire dans les bactériocytes. De même chez les Lucinidae, le relargage des symbiontes chez *C. orbicularis* n'a pas eu lieu en cas de carence en nourriture (Brissac *et al.*, 2009; Caro *et al.*, 2009).

Du point de vue d'un symbionte, le moment de l'infection de l'hôte peut jouer un rôle important dans son évolution et dans sa dispersion. Plus l'acquisition ne survient tôt dans le développement de l'animal, plus la dispersion des hôtes et des bactéries sera couplée. En

théorie, les symbiontes acquis par une larve dans l'habitat de ses parents pourraient venir enrichir la population du nouvel habitat colonisé par cette larve. A ce jour, il a été montré que chez les moules *Idas modiolaeformis*, la colonisation spécifique des branchies avait lieu chez les juvéniles à environ 700µm de longueur de coquille, c'est-à-dire après leur phase de dispersion et après la phase de recrutement dans le nouvel habitat colonisé (Laming *et al.*, 2014). Chez *R. pachyptila*, le mécanisme détaillé de la colonisation du trophosome a été décrit par Nussbaumer et collaborateurs (2006). D'après ce modèle, les bactéries colonisent le tube d'une post-larve déjà fixée à son support, en traversant la cuticule du juvénile et pénétrant le corps au moment de la différenciation du trophosome à partir du mésoderme. Les symbiontes en translocation sont libres dans le cytoplasme des cellules de l'hôte, tandis qu'une fois dans le trophosome, ils sont localisés dans des vacuoles et n'en sortiront plus (Nussbaumer *et al.*, 2006).

L'acquisition des symbiontes *de novo* à chaque génération exige la coordination spatio-temporelle entre les deux partenaires et implique des mécanismes moléculaires de reconnaissance entre l'hôte et la bactérie (Bright and Bulgheresi, 2010). Il a été suggéré que le mucus secrété par les cellules de l'hôte serait un attractant chimique qui faciliterait l'accumulation des symbiontes et la reconnaissance réciproque entre les deux partenaires (Nussbaumer *et al.*, 2006; Adin *et al.*, 2008). Chez les nématodes *Laxus oneistus*, par exemple, le dialogue moléculaire entre les deux partenaires pendant l'infection se fait à l'aide des lectines et d'autres protéines présentes à la surface des cellules ce qui permet l'accrochage mécanique d'un symbionte (Nussbaumer *et al.*, 2004; Bulgheresi *et al.*, 2006). Chez les moules, le mécanisme exact n'a pas encore été démontré. Le système immunitaire de l'hôte est encore une barrière à franchir par une bactérie au moment d'établissement de l'association symbiotique. Candidatus *Endoriftia persephone*, le symbionte de *R. pachyptila*, possède dans son génome des gènes de réponse et de résistance au système immunitaire de son hôte, ce qui confirme l'existence d'un « cross-talk » entre les deux espèces (Robidart *et al.*, 2008).

La co-spéciation entre les hôtes et leurs symbiontes n'est pas observée dans le cas des symbioses à transmission horizontale, comme cela a été montré chez les moules Bathymodiolinae (Won *et al.*, 2008; van der Heijden *et al.*, 2012). Ceci est particulièrement visible lorsque l'évolution des deux partenaires est comparée sur des arbres phylogénétiques (Figure 3-2) dont les branches respectives ne suivent pas la même topologie.

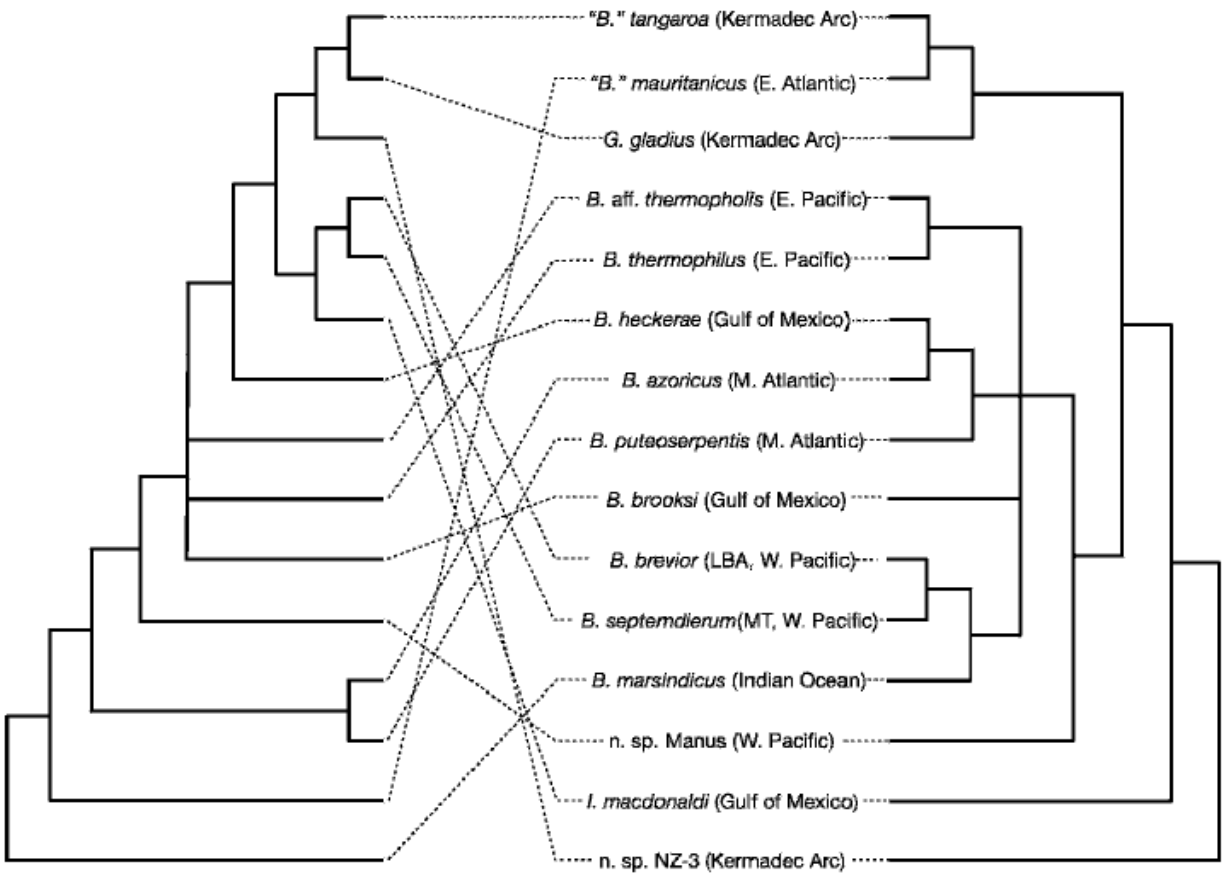


Figure 3-2 : Les relations phylogénétiques entre les symbiontes sulfo-oxydants et les moules de la sous-famille des Bathymodiolinae. Les symbiontes et leurs hôtes respectifs sont connectés avec les lignes en pointillé. L'arbre phylogénétique des symbiontes a été construit sur la base des séquences 16S de l'ARNr, celui des hôtes s'appuie sur les séquences des gènes ND4, COI et 28S ARNr. Source : Won *et al.*, 2008

Les symbiontes ré-acquis à chaque génération sont recrutés à partir d'une population des formes libres qui sont apparentées aux bactéries chimioautotrophes colonisant les habitats à base chimiosynthétique (Dubilier *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2012). Grâce à cette proximité phylogénétique, les échanges génétiques entre les différentes types bactériens sont fréquents, et défavorisent l'accumulation des mutations et la réduction du génome (Moran, 1996; Funk *et al.*, 2001; McCutcheon and Moran, 2012). Autrement dit, ces symbiontes doivent garder leur multi-fonctionnalité, c'est-à-dire leur capacité à vivre libre ou en symbiose, pour protéger leur indépendance.

3.1.2 Transmission verticale

Dans le cas de la transmission strictement verticale des symbiontes, le cycle de vie d'un hôte est entièrement symbiotique (Figure 3-1b). Une phase asymbiotique courte peut

avoir lieu en cas de transmission des symbiontes vers le zygote, si les symbiontes sont absents des gamètes. Dans la plupart des cas, la transmission verticale se fait par la lignée maternelle, via les ovocytes (Bright and Bulgheresi, 2010).

Dans les habitats marins à base chimiosynthétique, ce type de transmission a été suggéré chez les bivalves *Solemya reidi* (Cary, 1994) et *S. velum* (Krueger *et al.*, 1996b) de la famille des Solemyidae, ainsi que chez *Calyptogena soyoae* (Endow and Ohta, 1990), *C. magnifica*, *C. phaseoliformis* et *C. pacifica* de la famille des Vesicomyidae (Cary and Giovannoni, 1993). Chez les oligochètes *Phallodrilus leukodermatus* et *P. planus*, l'infection par les symbiontes présents dans les pores génitaux a lieu au moment de la ponte des oeufs, donc la phase asymbiotique est très courte (Giere and Langheld, 1987).

Chez *S. reidi*, l'ADN des symbiontes a été détecté dans les acini (ovaires) contenant les gamètes femelles, dans les œufs et dans les larves de 1 et 4 jours (Cary, 1994). Dans les ovaires de *Calyptogena* spp., les cellules germinales paraissent être déjà infectées par des bactéries supposées être les symbiontes (Endow and Ohta, 1990; Cary and Giovannoni, 1993). Les symbiontes des bivalves, pour être transmis dans les ovocytes, doivent subir une translocation entre les branchies et les gonades, mais les mécanismes exacts ne sont pas encore connus. Les étapes du voyage d'un symbionte vers les gonades n'ont pas été documentées chez les bivalves des grands fonds puisque ni la culture au laboratoire, ni la pêche *in situ* de tous les stades du développement des animaux ne sont possibles, contrairement à certaines espèces peu profondes. Du point de vue d'un symbionte, son voyage vers les gonades peut nécessiter le passage par tous les tissus de l'animal adulte et la bataille contre son système immunitaire, ou bien l'installation dans les gonades en développement chez les larves, post-larves ou juvéniles peut être moins compliquée.

Toutes les bactéries transmises verticalement sont des symbiontes obligatoires (du point de vue des bactéries). Elles ne nécessitent pas autant des gènes que les symbiontes recrutés depuis l'environnement, parce que leur milieu de vie est beaucoup plus stable et elles ne sont pas soumises aux changements de l'environnement. En conséquence, les échanges génétiques avec d'autres bactéries sont presque impossibles suite à l'isolement des symbiontes vis-à-vis de l'environnement. Seuls quelques symbiontes peuvent physiquement être transmis d'une génération à l'autre, puisque le volume d'un ovocyte est limité. Ce phénomène connu en génétique des populations porte le nom de « goulot d'étranglement de population » (ang. bottleneck). Ce phénomène accélère la dérive génétique car il réduit la diversité de la

population, et a des conséquences évolutives, comme l'accumulation des mutations et des allèles délétères (cliquet de Müller) (Moran, 1996; Peek *et al.*, 1998a; McCutcheon and Moran, 2012). La réduction du génome des symbiontes des Vesicomyidae (jusqu'à ~1,1 Mb) est une autre conséquence de cette transmission maternelle (Kuwahara *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2007). Contrairement aux bactéries acquises de l'environnement, les arbres phylogénétiques des symbiontes hérités de la lignée maternelle se superposent parfaitement à ceux de leur hôtes, ce qui suggère la co-spéciation stricte des deux partenaires (Peek *et al.*, 1998b; Goffredi *et al.*, 2003; van der Heijden *et al.*, 2012).

3.1.3 Transmission mixte

La transmission strictement verticale est parfois perturbée par un échange ponctuel de symbiontes entre deux animaux de la même espèce (ou de deux espèces proches), ou bien par une acquisition « accidentelle » de l'environnement (Figure 3-1c). L'acquisition latérale d'un phylotype bactérien distant de ceux décrits auparavant a ainsi été détectée chez un clam *Vesicomya* sp. de la famille des Vesicomyidae sur le site de la dorsale Juan de Fuca (Stewart *et al.*, 2008). Ce symbionte ne constituait que 2 % de la population totale. Les analyses plus détaillées ont démontré que cette lignée bactérienne est plutôt apparentée au symbionte d'une autre espèce de *Vesicomya* de la dorsale médio-atlantique. Avec l'augmentation de sensibilité des techniques moléculaires, notamment du séquençage moléculaire à haut débit, la détection des phylotypes rares est devenue possible. Dans la même région du Pacifique, deux phylotypes de symbiontes ont été identifiés dans les branchies de quelques *Vesicomya* sp., tandis que la majorité de la population ne portait qu'une seule lignée (Stewart and Cavanaugh, 2009). Plus récemment, Decker et collaborateurs (2013) ont confirmé la présence de deux symbiontes distants dans les branchies de deux espèces de bivalves du golfe de Guinée *Christineconcha regab* et *Laubiericoncha chuni* toujours de la même famille des Vesicomyidae. Chaque espèce portait dans ses branchies son symbionte principal ainsi que quelques bactéries de l'autre hôte. La présence de deux bactéries phylogénétiquement proches dans un animal peut faciliter des échanges génétiques entre elles. En effet, l'analyse de 13 loci distribués dans les génomes de 14 symbiontes des clams de la famille des Vesicomyidae a révélé des irrégularités, ce qui soutient l'hypothèse de recombinaisons homologues (Stewart *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent fortement que la transmission mixte, par la mise en contact de deux types de symbiontes, facilite la recombinaison et augmente la variation génétique des bactéries. En cas de transmission strictement verticale, ces deux bactéries endosymbiotiques

ne pourraient jamais se rencontrer, car elles resteraient isolées de l'environnement. La recombinaison compense l'effet du « Cliquet de Müller », un mécanisme irréversible d'accumulation des mutations défavorables caractéristique de la reproduction asexuée où il n'y a pas d'échanges génétiques (car pas de méiose) (Moran, 1996) et compense l'effet du « goulot d'étranglement de population ». L'impact réel de la recombinaison dépend bien sûr de la fréquence d'acquisition latérale des symbiontes (Stewart *et al.*, 2009).

Les différents modes de transmission des symbiontes ainsi que les notions de connectivité des bactéries et des métazoaires entre les sites, sont illustrés sur la Figure 3-3 et la Figure 3-4. Pour savoir d'où apparaissent les nouvelles lignées de bactéries symbiotiques dans un habitat donné, il faut analyser la connectivité bactérienne. Pour les symbiontes acquis à partir de l'environnement, c'est la colonne d'eau qui constitue le milieu. Dans le cas de ceux transmis verticalement, la connectivité bactérienne est conditionnée par la connectivité de l'hôte, sauf si le relargage des symbiontes dans l'environnement existe et a lieu au moment et à l'endroit appropriés.

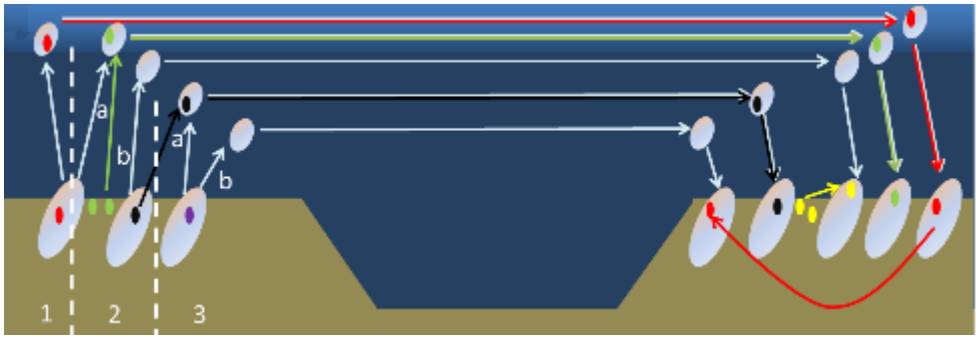


Figure 3-3 : Stratégies de la dispersion larvaire et bactérienne. 1 – des symbiontes transmis verticalement (bactérie rouge), 2 – des symbiontes acquis à partir de la population des formes libres de l'environnement d'origine (2a – bactérie verte) ou dans l'habitat définitif (2b – bactérie jaune), 3 – des symbiontes acquis latéralement à partir d'un autre hôte dans l'habitat d'origine (3a – bactérie noire) ou définitif (bactérie rouge) ; les situations 1, 2a et 3a facilitent la co-dispersion de l'holobionte. Source : Duperron *et al.*, 2013a

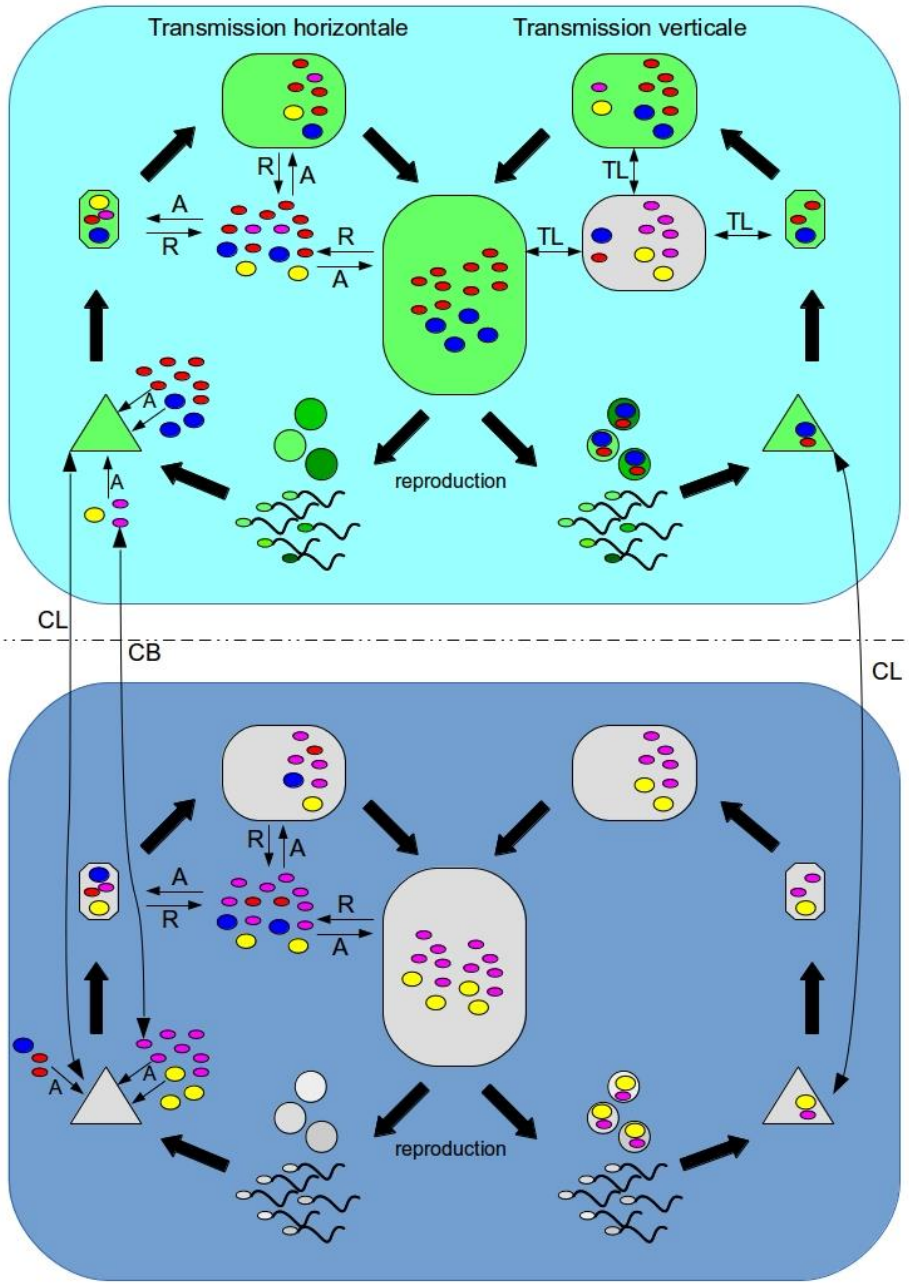


Figure 3-4 : Schéma présentant les interactions réciproques entre des symbiontes, des hôtes aux différents stades de développement et de l'environnement, en fonction du type de transmission des bactéries symbiotiques. Les deux environnements sont séparés par une ligne en pointillé. Les deux populations d'animaux sont marquées en vert et gris ; les cercles représentent des ovocytes ; les formes avec les flagelles représentent des spérmatozoïdes ; les triangles – des larves ; les octogones – des stades juvéniles ; les rectangles arrondis – des formes adultes d'âge différent. Les bactéries (symbiontes) méthanotrophes de deux environnements sont représentées par les ellipses bleues et jaunes ; les bactéries (symbiontes) sulfo-oxydant(e)s par les ellipses rouges et roses A – acquisition des symbiontes par l'environnement, R – relargage des symbiontes par des hôtes vers l'environnement, TL – transfert latéral des symbiontes entre deux hôtes, CL – connectivité larvaire entre deux habitats, CB – connectivité bactérienne entre deux habitats. Source : Figure originale

3.2 Connectivité

La connectivité assure les échanges génétiques entre deux populations. Plusieurs théories s'affrontent : une théorie régionaliste moderne selon laquelle l'expansion de toute espèce n'est limitée que par les barrières écologiques (environnement et géographie) quelle que soit la taille des organismes ; d'après une autre théorie, formulé dans les années 1930, les organismes de petite taille sont présents partout mais leur distribution réelle est conditionnée par les facteurs environnementaux, contrairement à la majorité des espèces de grande taille. Cette dernière opinion connue sous l'expression « Toute chose est partout, mais l'environnement sélectionne » (ang. *Everything is everywhere, but the environment selects*) a été formulée par le microbiologiste hollandais Lourens Baas Becking en 1934, inspiré par son collaborateur allemand Martinus Wilhem Beijerinck (De Wit and Bouvier, 2006). Cette hypothèse (appelée « hypothèse de Beijerinck ») est encore aujourd'hui régulièrement citée, mais elle est controversée. Les arguments en faveur de cette hypothèse retiennent surtout la petite taille des microorganismes qui facilite leur transport passif sur de très longues distances (courants marins et aériens) et le potentiel élevé de leur reproduction. Il n'y a donc pas de véritables barrières naturelles à leur translocation, d'autant moins quand il existe une production de spores résistantes.

Une étude de Cermeño and Falkowski (2009) démontre que l'hypothèse de Beijerinck peut s'appliquer au cas de microeucaryotes, les diatomées. Plus de 300 espèces de ces micro-algues unicellulaires (de 2 µm à 1 mm de diamètre) ont été prélevées dans tous les océans. Leur composition taxonomique est différente entre les zones tempérées et froides. En revanche, les zones exposées aux mêmes températures dans l'Atlantique et le Pacifique partagent presque 95% de leurs espèces. Il semble que les micro-organismes ne soient pas soumis aux mêmes forces évolutives que les animaux et végétaux de plus grandes tailles. Sont-ils donc cosmopolites mais peu divers à l'échelle mondiale? La réponse n'est pas encore connue, mais avec les nouvelles techniques de (méta-)génomique, elle est déjà en vue. L'analyse de la distribution des bactéries dans les différents habitats, couplée aux méthodes statistiques expliquant l'influence des différents facteurs environnementaux, permet d'approcher une biogéographie globale des microbes et de tracer les interactions possibles entre les différentes communautés.

Les modèles biogéographiques sont expliqués par la notion de spéciation qui est responsable de la création et la maintenance de la diversité et par la dispersion qui assure la connectivité (Ramette and Tiedje, 2007). Les auteurs posent le postulat de l'existence de taxons cosmopolites – ubiquistes et endémiques – spécifiques des habitats particuliers. L'une des premières études sur la diversité bactérienne à l'échelle globale, basée sur l'analyse de presque 22 000 OTUs d'ARNr 16S issues de 111 publications, a démontré que la salinité était un facteur majeur structurant les communautés microbiennes (Lozupone and Knight, 2007). Au niveau du type de substrat, les sédiments marins et les tapis microbiens dans l'eau de mer présentaient plus de diversité que les sols de la surface (Lozupone and Knight, 2007). Une autre étude, sur le même jeu de données mis à jour, confirme que la majorité des OTUs rares sont groupées dans des communautés séparées (spécialistes), en revanche, les OTUs abondantes sont distribuées dans plusieurs habitats à la fois (ubiquistes) (Nemergut *et al.*, 2011). La biogéographie des communautés bactériennes dans l'océan a fait l'objet d'une analyse effectuée par Ghiglione et collaborateurs (2012). Les échantillons analysés venaient de l'océan profond, des profondeurs intermédiaires et des eaux de surface, des zones côtières et de la haute mer, finalement de l'Arctique, l'Antarctique et des latitudes tempérées. Les communautés de surface du Nord et du Sud étaient différentes, en revanche, dans les eaux profondes les différences étaient moins évidentes. Les communautés polaires montraient plus des similarités entre elles qu'avec celles de la zone tempérée. Des différences importantes ont été notées entre les zones côtières et la haute mer quelle que soit la région. L'ensemble des résultats suggère la participation de différents mécanismes dans la structure et la diversité des communautés microbiennes dans l'océan profond et dans les eaux de surface (Ghiglione *et al.*, 2012). Ce résultat a été confirmé par une analyse de 10 millions de séquences courtes d'ARNr 16S provenant des différentes régions du Monde, à laquelle on a ajouté des échantillons des sédiments marins (Zinger *et al.*, 2011). Les communautés benthiques, pélagiques et côtières sont différentes. Le mélange physique dans la colonne d'eau rend la distribution des bactéries plus homogène. Autrement dit, plus la distance est importante, moins les communautés benthiques présentent de similarités entre elles, contrairement aux échantillons pélagiques qui sont homogénéisés par les courants d'eau de façon permanente. Zinger et collaborateurs (2011) proposent donc un modèle de la biogéographie des communautés bactériennes en fonction de leur localisation géographique, profondeur et type de substrat. Il est remarquable qu'à l'échelle locale, une des études donne des résultats contradictoires. Les communautés benthiques dans la mer de Chine méridionale sont similaires au niveau des divisions bactériennes quelle que soit la profondeur d'échantillonnage (Zhu *et al.*, 2013), tandis qu'elles

sont très variables entre les sites dans la zone Arctique (Jacob *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats indiquent une grande complexité dans les facteurs structurant les communautés bactériennes et confirme la nécessité d'une recherche approfondie sur ces aspects.

Les connectivités microbienne et animale sont souvent traitées séparément même si les larves (véligères) des bivalves – les vecteurs de colonisation, peuvent potentiellement être considérées à l'échelle « micro » (Figure 3-3 et Figure 3-4). Pourtant, les larves et les formes juvéniles peuvent porter les bactéries symbiotiques qui, en théorie, peuvent être ainsi transmises d'un habitat vers l'autre. La recherche des formes libres de symbiontes et leur caractérisation détaillée au niveau génétique et biogéographique est aussi d'un grand intérêt pour la compréhension des associations entre les bactéries symbiotiques et les métazoaires colonisant les habitats à base chimiosynthétique.

Deux stratégies de dispersion larvaire sont distinguées chez les bivalves et correspondent à des différences morphologiques : les larves planctotrophes qui se nourrissent de plancton et flottent dans la colonne d'eau à des profondeurs variables pendant des périodes plus ou moins longues pouvant traverser ainsi des distances importantes (larves teloplaniques); et les larves lécithotrophes profitant de réserves maternelles, riches en vitellus avec une autonomie et une période de nage avant la colonisation plus courtes, quoi que cela soit de nos jours discuté (Duperron *et al.*, 2013a). Les deux stratégies, montrées sur la Figure 3-5 influencent les modèles biogéographiques de la distribution des animaux adultes dans l'océan profond (Lutz *et al.*, 1984).

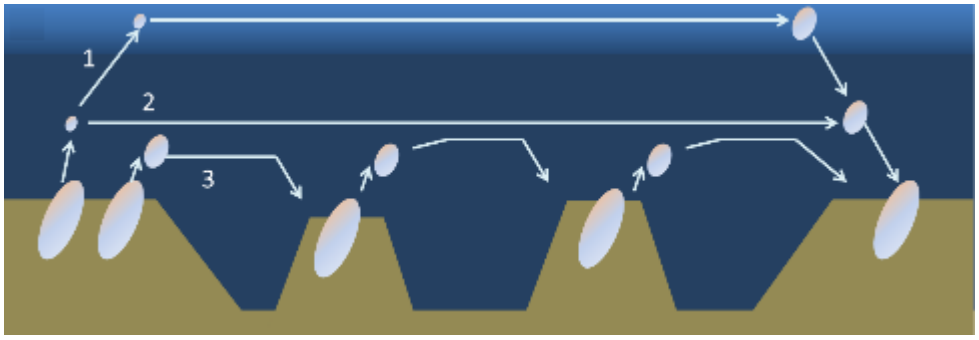


Figure 3-5 : Les stratégies de dispersion des larves des bivalves ; des larves planctotrophes sont capables de traverser de longues distances dans la zone photique (1) ou pélagique démersale (2) ; des larves lécithotrophes riches en vitellus se nourrissant sur les réserves maternelles et (3) et théoriquement parcourent des distances plus courtes que les larves planctotrophes qui se nourrissent et augmentent de taille pendant la dispersion. Source : Duperron *et al.*, 2013a

Malgré l'apport des techniques moléculaires d'identification disponibles (Pradillon *et al.*, 2007), très peu d'études documentent la dispersion larvaire des métazoaires symbiotiques, surtout à cause des difficultés à les échantillonner dans la colonne d'eau. Plusieurs études ont été effectuées à l'aide de modules de colonisation larvaire, constitués de polycarbonates, de morceaux de basalte, d' éponges, de titane et de substrats organiques, dans plusieurs régions du Monde (Van Dover *et al.*, 1988; Mullineaux *et al.*, 1998; Shank *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1999; Pradillon *et al.*, 2005, 2009; Kelly *et al.*, 2007; Gaudron *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2013b). Récemment, Arellano et collaborateurs (2014) ont identifié des larves de *Bathymodiolus childressi* dans la zone photique du golfe du Mexique. Les véligères sont capables de vivre jusqu'à 13 mois dans la colonne d'eau et d'emprunter des courants de surface (retrouvés à 100 mètres de profondeur). Elles pourraient potentiellement traverser l'océan Atlantique en se nourrissant de plancton pendant une année avant d'atteindre leur habitat cible. Ceci expliquerait la distribution trans-Atlantique d'au moins deux groupes de moules Bathymodiolinae : *Bathymodiolus childressi* / *B. mauritanicus* (Golfe du Mexique et Atlantique est, respectivement) et *B. boomerang/B.* aff. *boomerang* (Arc des Antilles et golfe de Guinée, respectivement) (Olu-Le Roy *et al.*, 2007a; Olu *et al.*, 2010). En général, les symbiontes et leurs hôtes ne sont pas soumis à la co-spéciation (Won *et al.*, 2008), mais les espèces de deux groupes de moules mentionnées ci-dessus sont phylogénétiquement proches et partagent des symbiontes apparentés (Duperron, 2010). Un autre axe nord-sud est clairement distingué le long de la dorsale médio-atlantique avec les moules *B. azoricus* (au nord) et *B. puteoserpentis* (au sud) séparées par une zone de transition où les deux espèces coexistent sur le site Broken Spur (O'Mullan *et al.*, 2001). Ces deux espèces partagent aussi les mêmes symbiontes (Duperron *et al.*, 2006). Une analyse plus récente des rapports phylogénétiques entre *Bathymodiolus* spp. et *Abyssogena southwardae* (Vesicomyidae) de l'Atlantique sud et leurs espèces sœurs du nord a confirmé la connectivité entre ces deux régions (van der Heijden *et al.*, 2012). La dispersion de *Bathymodiolus* spp. a probablement eu lieu du nord vers le sud parce qu'il y a des sites colonisés par *B. azoricus* au sud de l'équateur, malgré la zone de fracture Romanche qui pourrait constituer une barrière géographique. Les larves de Vesicomyidae, même si elles sont lécithotrophes et donc se dispersent en principe moins loin, peuvent traverser des distances plus longues qu'initialement supposées. Les phylotypes symbiotiques de *A. southwardae* sont identiques au nord et au sud de la dorsale médio-atlantique, ce qui est logique vu leur transmission maternelle. En revanche, les phylogénies de *Bathymodiolus* spp. du sud et de leurs symbiontes ne sont pas congruentes, les symbiontes présentent plus de similarités avec les bactéries du golfe du

Mexique (van der Heijden *et al.*, 2012). Un modèle de relations phylogénétiques similaires entre les moules *Idas modiolaeformis* et *I. macdonaldi* et leur symbiontes dans la Méditerranée et l'Atlantique nord a été proposé par Lorion et co-auteurs (2012). Les moules *I. modiolaeformis* peuvent avoir jusqu'à six types de symbiontes différents (Duperron *et al.*, 2008b).

3.3 Menaces potentielles liées à l'exploitation des ressources sous-marines

L'expertise scientifique collective (ESCo) sur les impacts environnementaux de l'exploration et de l'exploitation des ressources minérales profondes publiée récemment par les chercheurs du CNRS, de l'Ifremer et de l'UPMC, démontre que les environnements profonds peuvent potentiellement être impactés par l'exploitation des ressources minérales profondes, comme les sulfures hydrothermaux, les encroûtements cobaltifères et les nodules polymétalliques. Le fonctionnement de ces écosystèmes et la dynamique de leurs interactions avec le reste de la biosphère seront impactés par l'exploitation minière à cause de la destruction de l'habitat et de la faune, mais aussi par la formation d'un panache (un nuage de particules des sédiments en suspension) (Figure 3-6). Ce panache peut modifier la turbidité et la composition physico-chimique de l'eau, perturbant ainsi le transport des larves des animaux dans la colonne d'eau et polluant les habitats où la re-sédimentation aura lieu (ESCo, 2014). L'impact réel sur les écosystèmes marins profonds est imprévisible à l'heure actuelle, étant donné la part importante non explorée de l'océan. Notre compréhension de la biogéographie des espèces symbiotiques, tant du côté des hôtes que des symbiontes, reste toujours très fragmentaire, car basée sur un nombre réduit d'espèces et d'habitats analysés. Les « taches blanches » sur la carte (en particulier dans l'océan Indien et l'Atlantique Sud) restent à explorer, ce qui amènera de nouvelles découvertes et idées concernant la connectivité et la dispersion de ces organismes. Sans avoir bien compris les mécanismes de colonisation des habitats à base chimiosynthétique dans l'océan profond, nous ne pourrons pas estimer leur résilience et donc l'influence potentielle de l'exploitation de ses ressources.

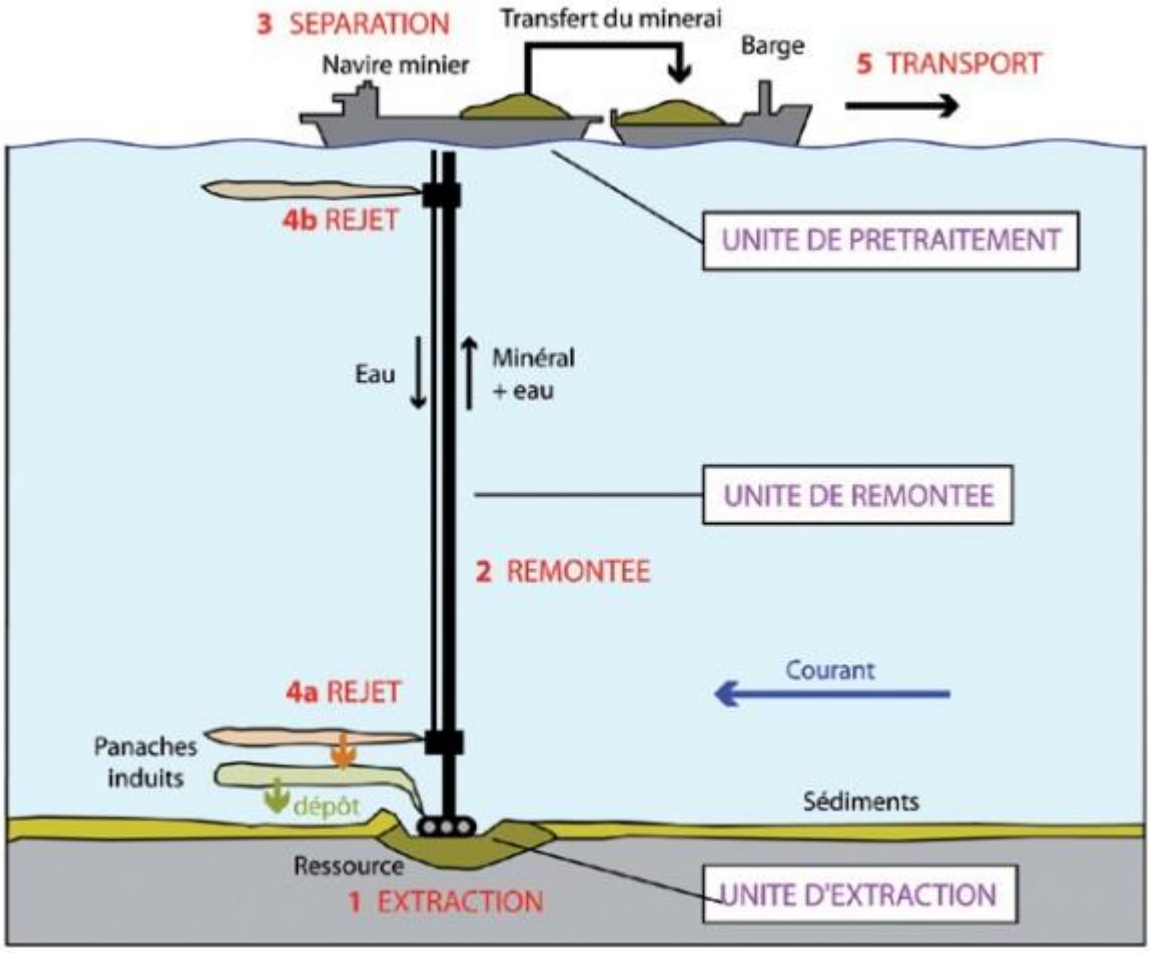


Figure 3-6 : Schéma de l'exploitation des ressources minérales marines profondes. Le minerai est extrait (1) et remonté (2) à bord du navire, avant d'être séparé (3) de l'eau qui est rejetée au fond (4a) ou en surface (4b) induisant des panaches, le minerai est ensuite transporté (5) à terre. Source : ESCo, 2014

4. Objectifs et approches méthodologiques de la thèse

Les symbioses entre les bactéries chimiosynthétiques et les métazoaires ont lieu dans les écosystèmes à base chimiosynthétique dont les plus remarquables se trouvent dans le milieu marin profond. Les différents types d'habitat, les exemples d'associations symbiotiques dans ces écosystèmes, ainsi que les scénarios possibles des cycles de vie des symbiontes ont été présentés dans les paragraphes précédents. Ceci ne reflète qu'une partie de la complexité des interactions entre les organismes vivants dans l'océan. Les différentes stratégies dans les cycles de vie des bactéries chimiosynthétiques font parties de l'héritage évolutif des associations symbiotiques avec les métazoaires. Cette thèse se focalise sur l'interaction particulière entre ces bactéries et les bivalves, pour mieux comprendre leur rôle dans les écosystèmes à base chimiosynthétique, où les animaux n'auraient pas pu atteindre de telles abondances sans leurs partenaires microbiens. L'objectif de la thèse est d'apporter des éléments de réponse à plusieurs questions précises qui portent sur les différentes étapes du cycle de vie des symbiontes : dans l'environnement, lors de la transmission maternelle et au sein des hôtes.

4.1 Quelle est la place des formes libres de symbiontes dans les communautés microbiennes?

Au sein des communautés bactériennes peuplant les habitats à base chimiosynthétique, des bactéries apparentées aux symbiontes ont parfois été trouvées (Lee and Ruby, 1992; Gros *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2008; Harmer *et al.*, 2008), notamment dans le cas des symbioses à transmission environnementale. Ceci pose plusieurs questions auxquelles nous avons essayé de répondre : où se trouvent les symbiontes dans l'environnement en cas de transmission horizontale? Quelle est leur abondance réelle dans l'environnement? Les bactéries identifiées sont-elles réellement des formes libres des symbiontes présents chez les animaux? Répondre à ces questions permettrait de mieux comprendre les échanges entre tissus animaux et habitats, et les propriétés de dispersion des bactéries (Figure 4-1).

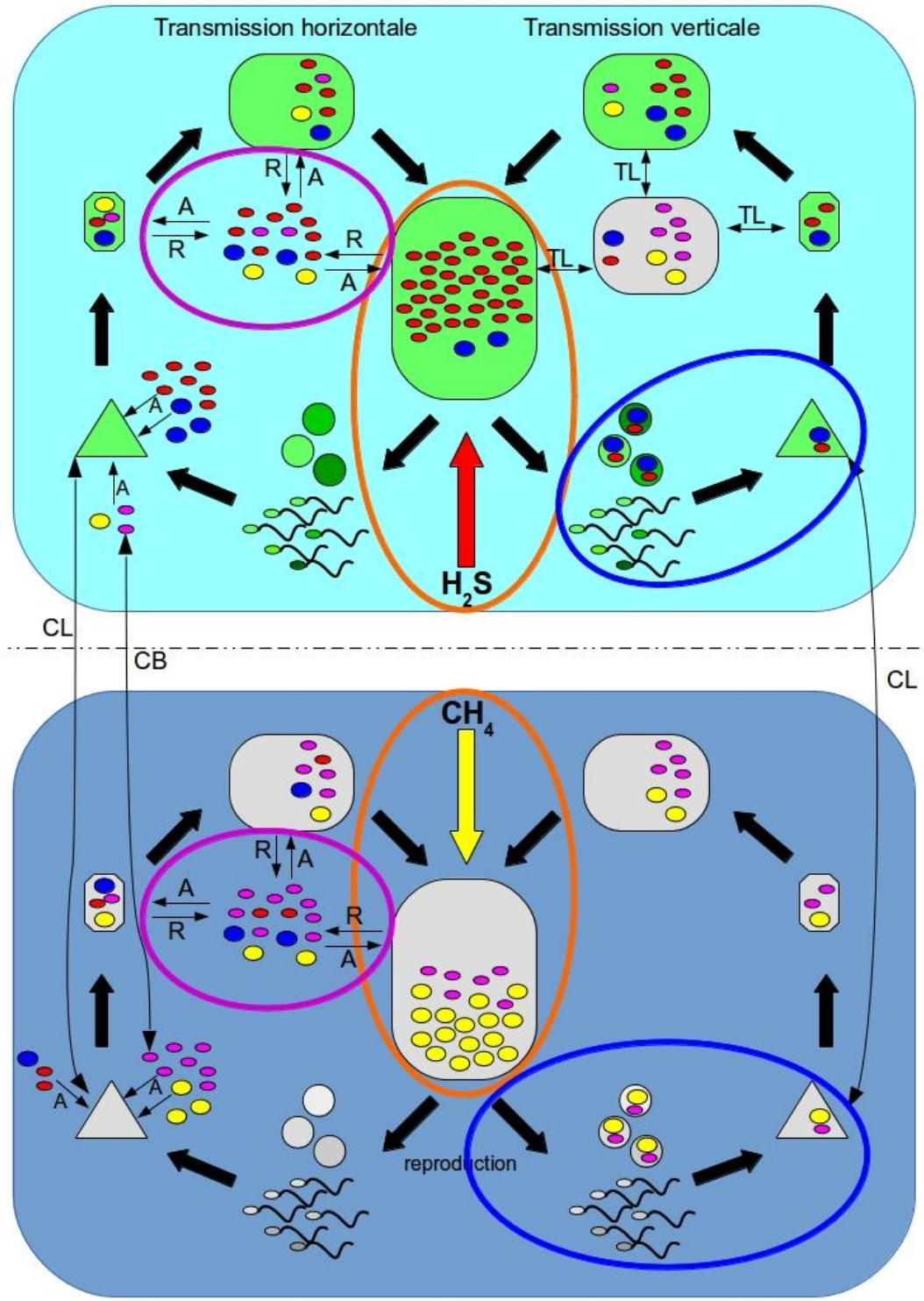


Figure 4-1 : Schéma de la Figure 3-4 modifié présentant les interactions réciproques entre des symbiontes, des hôtes aux différents stades de développement et de l'environnement, et les questions posées dans cette thèse. Une ellipse violette se réfère aux questions du chapitre 4.1 ; une ellipse bleue – chapitre 4.2 et orange – chapitre 4.3. Plus de détails dans la légende de la Figure 3-4. Source : Figure originale

En cas de transmission horizontale des symbiontes, il est logique d'espérer leur présence permanente ou transitoire dans les environnements colonisés par les hôtes. Puisque les symbiontes transmis horizontalement colonisent *de novo* les tissus des animaux aposymbiotiques, on peut supposer que ces bactéries font partie des bactéries pionnières, voire que leur présence conditionne l'installation des hôtes. Elles-mêmes ou leurs apparentés peuvent donc probablement être interceptées dans des modules de colonisation, et c'est cette approche que nous avons utilisé. Pour ce faire, nous avons étudié la composition et l'abondance relative des bactéries apparentées aux symbiontes, et comparé plusieurs habitats à base chimiosynthétique localisés dans l'océan Atlantique Nord et dans la mer Méditerranée orientale. Cette étude comparative a été réalisée à l'aide de modules de colonisation standardisés (CHEMECOLIs), remplis de deux types de substrats organiques et déployés sur 8 sites à des profondeurs de 354 à 2300 mètres pour une durée de 10 à 1112 jours, afin d'attirer la colonisation bactérienne. L'ADN a été extrait à partir des fragments des substrats couvert par le biofilm bactérien, en deux réplicats biologiques. La diversité bactérienne a été déterminée par pyroséquençage (454, Roche) de la région variable V5-V6 du gène codant pour l'ARNr 16S, amplifiée par PCR à l'aide d'un couple d'amorces universelles. Le « nettoyage » et les analyses des séquences, ayant pour but d'éliminer les erreurs de la PCR et du pyroséquençage ont été effectués. Dans une première étape, les séquences triées et attribuées aux unités taxonomiques opérationnelles (OTU) ont été utilisées pour comparer les échantillons en termes de diversité et de composition. Puis, les OTUs les plus abondantes dans l'ensemble des séquences ont été choisies et leur distribution dans chaque réplicat a été regardée. Ces résultats ont été analysés par des approches statistiques pour décrire les relations entre les échantillons. Grâce à l'analyse statistique multivariée, le poids des variables et des facteurs environnementaux dans la variance totale des échantillons analysés a été estimé.

Parmi ces séquences, nous avons ensuite identifié celles des bactéries symbiotiques, ou du moins leurs proches parents. Trois règles ont été appliquées. Premièrement, les substrats dont l'ADN a été extrait ont été au préalable vérifiés de la non présence de tissus animaux, pouvant potentiellement contenir des bactéries, afin d'éviter d'analyser celles déjà en relation symbiotique. Dans un second temps, la base de données des séquences issues du pyroséquençage contenant les 4 résultats de BLAST les plus pertinents a été scannée par le mot clé « symbiont » pour en extraire les séquences appartenant potentiellement aux bactéries symbiotiques. Enfin, un arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences candidates

pour estimer leur relation de parenté avec les séquences de symbiontes. Les séquences des symbiontes probables ont été comparées avec celles déjà confirmées et issues de la base de données publique. A cette étape-là, seules les séquences qui formaient des groupements monophylétiques sur l'arbre ont été retenues pour les analyses ultérieures. Les séquences confirmées comme les formes libres des symbiontes ou leurs proches parentes ont été ensuite triées par la région géographique d'échantillonnage et par la famille taxonomique des hôtes.

La caractérisation des communautés colonisant les substrats déployés sur le fond et la recherche des bactéries apparentées aux symbiontes de métazoaires est présentée dans l'article scientifique 1. La biogéographie des formes libres des symbiontes en fonction de la biogéographie de leurs hôtes et les paramètres physico-chimiques qui peuvent structurer les populations bactériennes et symbiotiques y sont discutés.

4.2 Comment les symbiontes se transmettent-ils d'une génération à l'hôte ?

Le deuxième volet de cette thèse concerne les modes de transmission des symbiontes entre deux générations d'hôtes. Deux modes sont distingués et ont été décrits en détails dans le chapitre 3 : la transmission horizontale où les bactéries sont présentes dans l'environnement et acquises *de novo* par les métazoaires et la transmission verticale dans laquelle les bactéries passent par les gamètes, et où l'association symbiotique est innée et héritée. Pour certains groupes d'animaux, la manière dont les bactéries sont transmises a été décrite, pour les autres ce n'est toujours pas certain ou pas analysé. Les questions que l'on se pose sont les suivantes : quel type de transmission observe-t-on chez les différents groupes de bivalves? Où se trouvent les symbiontes en cas de transmission verticale? Quand et comment les symbiontes s'associent-ils aux métazoaires? Répondre à ces questions permettra de savoir si l'évolution des symbiontes est plutôt dépendante de leur vie dans l'hôte ou dans l'environnement.

Pour aborder ces questions, les symbiontes ont été recherchés, identifiés et localisés dans les gamètes et les post-larves d'*Isorropodon bigoti*, un bivalve de la famille des Vesicomyidae échantillonné sur le site de suintement froid « Guiness » dans le golfe de Guinée à une profondeur de 582 mètres. Les individus ont été inclus dans de la paraffine, coupés au microtome, colorés à l'hématoxyline et éosine afin de visualiser les gonades. Le sexe des animaux a pu ainsi être déterminé et les gamètes à différents stades de développement ont été étudiés. Des expériences préliminaires avec la technique CARD-FISH (Fluorescence *in situ* hybridization with Catalyzed Reporter Deposition) (Pernthaler *et al.*,

2002) ont permis de visualiser le signal spécifique des bactéries symbiotiques dans les gonades. Le FISH 'classique' couplé à la microscopie confocale a permis d'utiliser deux sondes FISH en même temps, et de visualiser la localisation des symbiontes à l'intérieur des gamètes femelles à tous les stades de l'ovogenèse, confirmée par une série d'images au microscope électronique à transmission. En parallèle, quelques post-larves échantillonnées à l'aide des CHEMECOLIS déployés en Méditerrané orientale (Gaudron *et al.*, 2010) ont été testées pour la présence des symbiontes. L'identité des post-larves (genre *Isorropodon*) a été confirmée par séquençage d'un gène marqueur de l'hôte. La même approche a été utilisée sur des bivalves adultes des familles Mytilidae (*Idas* sp.) et Thyasiridae (*Thyasira* sp.). La translocation des bactéries vers les gonades et les conséquences évolutives de la transmission maternelle des symbiontes chez *Isorropodon bigoti* sont discutées dans l'article scientifique 2, et les résultats préliminaires sur les Mytilidae et Thyasiridae sont présentés en annexe de cet article.

4.3 Quelle est la dynamique des populations de symbiontes au sein des tissus de leurs hôtes ? Est-elle adaptative?

La dynamique de l'association symbiotique consiste en des variations d'abondance de bactéries dans les tissus, et peut impliquer l'acquisition de bactéries au cours de la vie, leur multiplication, leur digestion et leur relargage éventuel dans l'environnement (Figure 4-1). Dans le cas des symbioses doubles chez les Mytilidae, impliquant des bactéries sulfo-oxydantes et méthanotrophes, il a été démontré que le ratio entre les deux types de symbiontes varie en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'environnement (Kádár *et al.*, 2005; Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008, 2010). Le phylotype qui domine est habituellement celui dont le substrat du métabolisme est majoritaire dans l'environnement. Dans cette thèse les questions suivantes sont posées : quelle est l'abondance et la composition des populations de symbiontes dans les tissus des bivalves? Les variations permettent elles d'optimiser l'accès aux ressources disponibles? L'organisme choisi pour ce volet est la moule *Bathymodiolus azoricus* qui abrite deux types de symbiontes.

B. azoricus a été échantillonné lors de la campagne océanographique BioBaz 2013 sur les sources hydrothermales Menez Gwen (860m de profondeur), Lucky Strike (1700m) et Rainbow (2300m). L'ensemble des manipulations ont été réalisées à bord du bateau jusqu'à la fixation des échantillons. L'étude comporte trois volets. Dans la première partie il s'agit

d'évaluer l'effet de la remontée (avec ou sans décompression) des animaux à la surface sur les densités de symbiontes. Puisque les sources hydrothermales de la dorsale médio-atlantique sont situées à des profondeurs dépassant 800 mètres, la pression qui y règne est au moins 80 fois plus élevée qu'à la surface. La remontée qui dure seulement quelques dizaines de minutes est un choc pour les animaux vivants, et on ne peut pas être sûr des mesures effectuées ultérieurement. Ceci a souvent été reproché aux études précédentes. Ici, grâce à PERISCOP – un aquarium à haute pression, développé par Shillito et collaborateurs (2008) et permettant de remonter les animaux à leur pression native, il a été possible de comparer l'effet d'un échantillonnage isobare à celui d'un échantillonnage classique impliquant une décompression. Dans le deuxième volet, la flexibilité de la symbiose est testée en réponse à divers stress chimiques et thermiques. Les sources hydrothermales sont considérées comme des milieux instables, où à cause des courants d'eau et de la dynamique des fluides en sub-surface, on observe des variations de composition chimique et de température importantes à petite échelle de temps et d'espace. Dans cette étude, les moules *B. azoricus* remontées à la surface dans les conditions natives ont été soumises à des concentrations élevées en sulfure d'hydrogène (H_2S) et/ou en source de carbone ($NaHCO_3$), ou encore à un choc thermique de 25°C (température sub-létale) d'une durée d'une heure. La comparaison de différentes méthodes de quantification des symbiontes fait l'objet du troisième volet. Deux méthodes indépendantes ont été utilisées pour quantifier les symbiontes dans les branchies des moules. La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a permis d'estimer le volume relatif occupé par chaque phylotype des bactéries symbiotiques. Par ailleurs, le ratio entre les deux phylotypes bactériens a été analysé par pyroséquençage. L'abondance et la composition des symbiontes dans les tissus des moules *B. azoricus* ainsi que la flexibilité et la stabilité de l'association symbiotique en réponse aux stress abiotiques sont discutées dans l'article scientifique 3.

En s'attachant à apporter des réponses, même partielles, à ces différentes questions, la présente thèse contribue à améliorer notre compréhension du cycle de vie des bactéries symbiotiques associées aux bivalves de l'océan profond dans et en dehors de leurs hôtes. Les résultats obtenus au cours des différents volets de la thèse et concernant les trois problèmes abordés sont intégrés dans les articles scientifiques inclus dans la partie suivante. La synthèse et la discussion générale des résultats de ces travaux sont incluses dans le chapitre 8.

5. Article scientifique 1 « Colonization experiment using plant substratesreveal symbiont related bacteria at hydothermal vents and cold seeps »

Les résultats obtenus dans ce volet de ma thèse sont présentés sous la forme de l'article scientifique soumis dans le Journal ISME. Les figures et les tableaux principaux et supplémentaires sont présentés après le texte du manuscrit.

Résumé

Des composés chimiques réduits comme des sulfures et du méthane présents à des concentrations élevées dans les écosystèmes marins profonds tels que les sources hydrothermales, les suintements froids ou les débris organiques, sont des substrats de la production primaire par chimiosynthèse. Pour comprendre l'écologie microbienne des grands fonds marins, l'analyse de la diversité, la colonisation et la dispersion des bactéries est d'importance capitale. La faune associée aux débris organiques et celle colonisant les sources hydrothermales et les suintements froids, entrent souvent en symbioses avec des bactéries chimiosynthétiques. Un nombre important d'entre elles, sont transmises horizontalement par l'environnement entre les différentes générations d'une même espèce d'animal. Ceci implique l'existence de formes libres de symbiontes, qui peuvent coloniser les tissus des hôtes ciblés. Les symbiontes eux-mêmes et leurs proches parents sont toujours peu connus à l'heure actuelle.

Cette étude présente une description détaillée des communautés bactériennes colonisant les substrats végétaux déployés dans les différents habitats à base chimiosynthétique de l'Atlantique nord et de la Méditerranée. Des modules de colonisation standardisés, remplis des cubes du bois et/ou de la luzerne, ont été immergés pour des périodes variables dans 8 habitats à base chimiosynthétique différents dans 4 régions de l'Océan. Les communautés bactériennes ont été caractérisées par du pyroséquençage 454 de la région variable V5-V6 du gène codant de l'ARNr 16S. Les résultats ont permis d'identifier les bactéries qui ont colonisées ces substrats. Les tests statistiques démontrent les effets des facteurs et des variables tels que la région, le type du substrat, la profondeur, la durée du déploiement et la température de l'eau sur la composition des communautés bactériennes des différents habitats. Qui plus est, des séquences de bactéries proches des symbiontes ont été identifiées. Leur

présence dans les régions analysées est associée à celle de leurs hôtes respectifs. L'importance des bactéries apparentées aux symbiontes dans les communautés bactériennes de l'océan profond est discutée.

Manuscrit soumis

Colonization experiments using plant substrates reveal symbiont-related bacteria at hydrothermal vents and cold seeps

Kamil M. Szafranski[1], Philippe Deschamps[2], Marina R. Cunha[3], Sylvie M. Gaudron[1], Sébastien Duperron[1,4,*]

1 UMR7208 Laboratoire Biologie des Organismes Aquatiques et Ecosystèmes (UPMC CNRS MNHM IRD U.CAEN), Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Paris, France

2 UMR8079 Unité d'Ecologie, Systématique et Evolution – CNRS Université Paris-Sud 11, Orsay, France

3 Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, Aveiro, Portugal

4 Institut Universitaire de France, Paris, France

* Corresponding author: Sébastien DUPERRON

address: UMR 7208 BOREA, Adaptation aux Milieux Extrêmes
Université Pierre et Marie Curie
Bât A, 4ème étage, 7 quai St Bernard
75005 Paris, France

Tel: +33 (0)1 44 27 39 95

Fax: +33 (0)1 44 27 58 01

e-mail: sebastien.duperron@snv.jussieu.fr

running title: **Free-living relatives of chemosynthetic symbionts**

Subject Category:

Microbial population and community ecology

Microbial ecology and functional diversity of natural habitats

Abstract

Reducing conditions with elevated sulphide and methane concentrations in ecosystems such as hydrothermal vents, cold seeps or organic falls, are suitable for chemosynthetic primary production. Issues related to the bacterial diversity, colonization and dispersal processes are of prime importance for our understanding of deep-sea microbial ecology. Besides, organic fall-associated and vent/seep faunas include various metazoans harbouring chemosynthetic symbionts, many of which are environmentally acquired at each generation. This implies the existence of free-living forms of symbionts that may inoculate appropriate hosts. Still little is known about symbionts and their closest relatives in the environment. This study provides a detailed characterization of bacterial assemblages colonizing plant-derived substrates using a standardized approach over a geographic area spanning the North-East Atlantic and Mediterranean. Wood and alfalfa substrates in colonization devices were deployed for different periods at 8 deep-sea chemosynthesis-based sites in 4 distinct geographic areas. Pyrosequencing of a fragment of the 16S rRNA-encoding gene was used to describe bacterial communities. Results yield information on the identities of bacteria colonizing wood and alfalfa substrates in various chemosynthesis-based habitats. Comparisons of bacterial communities from different habitats inform how they are influenced by the region, type of substrate, depth, duration of deployment, and water temperature. Among recovered sequences, numerous symbiont-related sequences were identified. Their occurrence patterns are similar to those of their respective metazoan hosts. The significance of these symbiont-related bacteria in the communities is discussed.

Keywords: cold seeps/colonization/deep-sea/free-living symbiont/hydrothermal vents/wood falls

Introduction

Hydrothermal vents and other chemosynthesis-based ecosystems like cold seeps or organic falls are deep-sea hotspots of primary production, which is ensured by chemoautotrophic prokaryotes, many of which live in symbiosis with various metazoans (Van Dover, 2000; Dubilier *et al.*, 2008). The deep-sea ecosystem can also benefit from significant input of exogenous sources of carbon such as plant remains of different origins, like sunken wood (Wolff, 1979). Wood falls contain cellulose, hemicellulose and lignin, *i.e.* energy-rich polysaccharides that can be degraded by microbial assemblages. In anaerobic conditions, this results in the production of reduced compounds such as hydrogen sulfide, dihydrogen and methane, providing a niche for thiotrophic and methanotrophic bacteria (Leschine, 1995; Palacios *et al.*, 2006). Wood falls, but also whale skeletons and others large inputs of organic material, are quickly localized and efficiently colonized by opportunistic fauna (Turner, 1973; Bennett *et al.*, 1994; Smith & Baco, 2003; Baco & Smith, 2003; Laurent *et al.*, 2013). Reducing conditions with elevated sulfide concentrations around degrading organic falls also constitute a prime environment for chemoautotrophic bacteria colonization, and foster sulfide-oxidizing symbioses (Duperron *et al.*, 2008; Lorion *et al.*, 2009; reviewed in: Dubilier *et al.*, 2008; Laurent *et al.*, 2009; Treude *et al.*, 2009). Seep and vent ecosystems are distributed worldwide but are often separated by large distances, and various authors postulated that organic falls could act as stepping stones between habitats (Vrijenhoek, 2010). Nevertheless, the most successful animal colonizers remain specialists for one substrate type, remarkable examples including *Xylophaga* spp. or *Xyloredo* spp. bivalves on wood (Turner, 1973; Distel & Roberts, 1997) and *Osedax* spp. polychaetes on bones (Rouse *et al.*, 2004; Glover *et al.*, 2005).

Studies on the associated microbial assemblages remain scarce. The first trial to investigate and compare free-living and attached prokaryotic assemblages from sunken wood at several sites and water depths was carried out by Palacios *et al.* (2009). Authors combined electron microscopy and molecular fingerprinting (capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphisms – CE-SSCP) to test the influence of depth of immersion, geographic location, deployment time, and wood type on the structure of microbial assemblages (Palacios *et al.*, 2009). The phylogeny and diversity of Bacteria and Archaea associated with wood falls was recently investigated using clone libraries (Fagervold *et al.*, 2012), and authors demonstrated the occurrence of various free-living sulfate-reducing and sulfur-oxidizing bacteria (SRB and SOX respectively) and methanogenic archaea. This

microbial community was modified with time of immersion because of changes in wood chemistry. The combination of ARISA fingerprinting and 454 pyrosequencing recently allowed Bienhold *et al.* (2013) to gain a more detailed overview of bacterial assemblages in a pine wood deployment lasting 1 year and surrounding sediments at a cold seep site in the Eastern Mediterranean Sea. They established that wood-boring bivalves, cellulolytic and sulfate-reducing bacteria colonized the organic substrate first, and then attracted chemosymbiotic fauna (Bienhold *et al.*, 2013). Finally, using pyrosequencing, Fagervold *et al.* (2013) also demonstrated that the microbial diversity in oak cubes deployed at the Blanes Canyon (Western Mediterranean Sea) was significantly higher compared to cubes deployed in the adjacent open slope (Fagervold *et al.*, 2013). To date, these high-throughput diversity studies include a single region, use only one substrate type, and are all based on different experimental designs, and as a consequence knowledge of deep-sea wood-associated microbial assemblages is still scarce.

Organic fall-associated and vent/seep faunas include many metazoans harbouring chemosynthetic symbionts, and many of these symbionts are environmentally acquired anew at each generation (Duperron *et al.*, 2008; Lorion *et al.*, 2009; Gros *et al.*, 1996; McFall-Ngai, 2000; Nussbaumer *et al.*, 2006; Won *et al.*, 2003; reviewed in: Dubilier *et al.*, 2008; Bright & Bulgheresi, 2010; Vrijenhoek, 2010). This mode of symbiont transmission implies the existence of free-living forms of symbionts which may infect the appropriate host, and for which symbiotic lifestyle may be facultative (Bright & Bulgheresi, 2010). Only few studies successfully documented the occurrence of such free-living symbionts in marine shallow waters (Lee & Ruby, 1992; Gros *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2008), even less in the deep sea (Harmer *et al.*, 2008). In which habitat and numbers do these free-living forms exist thus remains an open question.

Since 2006, colonization devices (CHEMECOLIs) filled with wood cubes and alfalfa grass were deployed for various periods of time at several chemosynthesis-based sites located in the Eastern Mediterranean, the Gulf of Cadiz, the Mid-Atlantic Ridge and the Haakon Mosby Mud Volcano. Substrates in these standardized modules are protected against large grazers by a plastic net (2 mm mesh size, Gaudron *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2013). In this study, we characterize the bacterial communities colonizing these organic substrates. The aims are to identify bacteria colonising the substrates, to evaluate the effect of region, type of substrate, depth, duration of deployment, and temperature on the bacterial assemblages, and to screen for potential free-living forms or relatives of metazoan-associated chemosynthetic symbionts.

For this, a 454 pyrosequencing-based approach on a 16S rRNA-encoding gene fragment is employed.

Material and methods

Sampling

Thirteen sets of standardized colonization devices (CHEMECOLI: CHEMosynthetic Ecosystem COlonization by Larval Invertebrates, described by Gaudron *et al.* (2010)) were deployed at 8 hydrothermal vents and cold seeps sites located in 4 distinct geographic areas: the Mid-Atlantic Ridge (MAR, 3 sites), the Gulf of Cadiz (GoC, 3 sites), the Eastern Mediterranean (EM, 1 site) and the Norwegian Sea (Haakon Mosby Mud Volcano, HMMV, 1 site). Each set consisted of two CHEMECOLIs, one filled with dried alfalfa grass and the second with 2 cm pine wood cubes. Deployment sites were located at depths ranging from 354 m to 2300 m. CHEMECOLIs were deployed a few meters away from any visible fluid escape and recovered in individual sterile-water filled hermetic boxes after periods of 10 days to 3 years. Operations were performed by various ROVs (Remotely Operated Vehicles) over the course of 13 cruises spanning over years 2006-2013 (Table 1). Immediately after recovery, pieces of alfalfa and wood cubes were randomly selected in a cold room, fixed in 96% ethanol and stored at 4°C until DNA extraction. Substrates from a short-term deployment at Menez Gwen were also frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C in order to compare different sample fixation procedures (A13_C, B13_C). Non-deployed substrates were used as controls (A00 and B00).

DNA extraction and 454 pyrosequencing

Samples were screened under a dissecting microscope to check for the absence of animal material (tissue, eggs and larvae). Wood cubes were cut in thin slices and homogenized (90 s) in a metal jar with beads (12 mm diameter) using a Retch MM301 BeadBeater (Retch, Germany). Alfalfa samples were ground to powder in liquid nitrogen. A modified Doyle & Doyle (1987) DNA extraction protocol was applied. About 200-300 mg of powder was mixed with 1 mL of preheated CTAB isolation buffer containing 2% hexadecyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1% PVP and 0.2 mg*mL^{-1} proteinase K. Samples were agitated (1 hour, 60°C) then mixed with one volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1). Nucleic acids from the upper aqueous phase were precipitated by isopopropanol and centrifuged. Dry DNA pellets were re-suspended in sterile water. Concentration and quality were checked. DNA extraction was performed in

duplicate, using another randomly selected wood cube or alfalfa grass sample from the same CHEMECOLI, resulting in two replicates (A-Bxx_1 and A-Bxx_2).

Primers V5V6_F (CAAACAGGATTAGATACCCTG) and V5V6_R (CGTTRCGGGACTTAACCCAACA) were used to amplify the V5-V6 hypervariable region corresponding to regions 770-1094 in the *E.coli* 16S rRNA-encoding gene. Short (~300bp) pyrotags were sequenced by 454 pyrosequencing (GsFLX-Roche Diagnostics, GENOSCREEN, France). A 10-bp molecular identifier (MID) tag was inserted between the Gs-FLX adapter and the specific primer to facilitate further sequence binning. PCR products were purified and quantified by Picogreen and the same amount of amplicons was mixed prior to 454 pyrosequencing. 5/8 of a plate was used to sequence 52 samples (including replicates), expecting a minimum of 7700 reads per sample. Sequences have been submitted to MG-RAST (http://metagenomics.anl.gov/linkin.cgi?project=9917).

Reviewer Token

http://metagenomics.anl.gov/?page=ClaimToken&token=5ORVY7A8dHguMJOKFWYAdYd7RvlJgU9VL__kq30HOQfQlDJv3X&type=project

Data analyses

Resulting binary '.sff' files were extracted using Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Sequences shorter than 250 bp, longer than 350 bp and containing Ns were eliminated from further analysis. Filtered sequences were sorted by their MID sequences into separate Fasta files. Typical 454 sequencing errors and PCR single base errors were screened using the PyroNoise and SeqNoise modules of the AmpliconNoise software (Quince *et al.*, 2011) with default parameters. Sequences with MIDs and primers removed were used to generate a Needleman-Wunsch distance matrix (function NDist) and clustered into operational taxonomic units (OTUs, function Fcluster) using the same software. Three matrices of sequence abundances per OTU were generated using Python scripts using 90%, 95% and 97% identity thresholds for OTU definition (Dataset_1 in Table S1). The four best hits (maximal e-value=$1e^{-10}$) for each OTU were found using BLAST (Altschul *et al.*, 1997) using the SSURef_NR99_115 Silva database (Quast *et al.*, 2013), and added to the OTU abundance matrix.

Analyses of OTU abundances and samples comparison

The microbial α-diversity indices (Shannon and Invsimpson), community microbial richness indices (Chao1 and ACE) and rarefaction data were computed with Mothur on Dataset_1 for three identity thresholds (Schloss *et al.*, 2009). The second dataset with rare OTUs eliminated, was screened for symbiont-related sequences and was prepared by eliminating all sequences

present in less than 5 copies in the total number of reads per sample (Dataset_2 in Table S1). For further community abundance and statistical analyses, OTUs containing in total less than 40 sequences, which represents 1% of the total number of sequences in the smallest sample (4543) were eliminated, thus generating a reduced data matrix with abundant sequences (Dataset_3 in Table S1). All statistical analyses were performed using R (R Development Core Team, 2013). Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) was performed using 'metaMDS' function in the MASS package. Average agglomerative clustering dendrograms were generated using Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Average (UPGMA) on a Bray-Curtis distance matrix. Abundance data were transformed using the Hellinger method (Legendre & Gallagher, 2001) and then used for transformation-based redundancy analyses (tb-RDA). Substrate type and region were used as factors and water temperature, depth and deployment time were used as variables into the constrained RDA, in order to estimate their contribution to the global variance. Significance was assessed using permutation tests.

Identification of OTUs related to metazoan-associated bacterial symbionts

The Dataset_2 was used for screening for symbiont-related sequences. OTUs related to symbiotic sequences were filtered by scanning blast hit definitions for the "symbio" key word (Potential_symbionts in Table S1). A phylogenetic tree was computed in order to evaluate the phylogenetic relationship of analyzed sequences to known symbionts. For this, 16S rRNA sequences of symbiotic bacteria from vent and seep metazoans and best blast hits from our OTUs were aligned with SINA Web Aligner (Pruesse *et al.*, 2012) and truncated to the V5-V6 region. Symbiont-related OTUs from this study were added to this dataset, aligned with ClustalX (Larkin *et al.*, 2007), and alignments were manually checked. Phylogenetic relationships among sequences were estimated from a 250-bp alignment with MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) using distance methods and neighbour-joining. Bootstrap values were computed on 1,000 replicates. Based on the tree, only OTUs which displayed a symbiont as their closest relative were considered the most reliable candidates for free-living forms of symbionts (Confirmed_symbionts in Table S1).

Results

Preparation of datasets

Bacterial diversity was investigated on 25 individual CHEMECOLIs filled with either pine wood cubes or alfalfa and deployed for periods of 10 to 1112 days in four areas in the North East Atlantic and Mediterranean. A total of 564925 V5-V6 reads was obtained. After length

filtering, elimination of PCR and random sequencing errors, a raw dataset containing 364633 sequences distributed in 22721 OTUs (97% cut-off) was obtained. Screening for symbiont-related sequences was made on a reduced dataset including 332621 sequences representing 2641 OTUs. Community composition and comparisons were performed on a dataset containing only abundant sequences, overall 306716 sequences in 658 OTUs. On average, dataset sizes were reduced by 35%, 41% and 46% of total read numbers and contained 7012, 6397 and 5898 sequences per sample (2 replicate samples per CHEMECOLI). Details on sequence abundances in each sample and dataset, and the mean number of reads per sample are summarized in Table S1.

Taxonomic richness and diversity

Rarefaction curves based on a similarity threshold of 97% were generated for each substrate type separately (Figure S1 A-B). Generally, alfalfa samples showed more diverse bacterial communities than their wood equivalents. This was confirmed by bacterial community richness and diversity indices (Table 2). Among alfalfa samples, all long-term ones (>289 days of deployment) from Gulf of Cadiz cold seeps (GoC), Eastern Mediterranean cold seep (EM) and Lucky Strike (L-S) hydrothermal vent on Mid Atlantic Ridge (MAR) (A01-A04, A05 and A08) presented more diverse bacterial communities than other samples (Table 2). In samples mentioned above the Chao1 index was higher than 1,500 and the Shannon index had a value higher than 5. On any given set of CHEMECOLIs, the bacterial community was less diverse in wood than alfalfa samples (Table 2). Within wood samples, B02, B03 and B08 (from GoC and L-S) had the highest values of all considered diversity indices (Table 2). Replicate samples for both alfalfa and wood displayed comparable values for all analyzed diversity indices (Table 2), with two exceptions, namely the replicates in a GoC alfalfa sample (A02_1-2), and a short-term wood sample from MAR (B11_2-3) (Table 3). Although Shannon and Invsimpson diversity indices showed similar values for the two A02 replicates, replicates from B11 displayed a 6-fold difference in their Invsimpson index (Table 2).

Taxonomic composition of bacterial communities

At the division or sub-division level, 10 taxa included altogether more than 96% of all sequences present in Dataset_3 (Figure 1; Table S2). Proteobacteria was the most abundant division in this dataset and alone represented above 85% of the total number of reads (Figure 1; Table S2). Within them three taxa (Gamma-, Delta-, and Alphaproteobacteria) corresponded to 77% of the total number of amplicons (Table S2). Gammaproteobacteria were remarkably over-represented in short-term samples (A-B11; B12 and A13, Figure 1;

Table S2). Epsilonproteobacteria were also highly abundant in short-term samples (A-B11 and A-B13), while not exceeding 2% of total sequence numbers in long term samples. They were particularly dominant (98%) in the short-term wood sample from M-G on MAR. While almost absent from short-term samples, Delta- and Alphaproteobacteria represented a significant fraction of reads in all long-term samples. Other taxa represented below 30% of reads per sample.

For further community analyses at the OTU level, we focused on the most abundant OTUs, which represented above 1% of the total number of sequences in the dataset (> 3000 amplicons; Table S3). 15 OTUs within the Proteobacteria and 1 within the Bacteroidetes matched this criterion, representing 131712 sequences (almost 43% of the total sequences) (Figure 2; Table S3). All were related to marine bacteria. Four major OTUs (OTU_00201, OTU_11277, OTU_00411 and OTU_00023) were abundant in almost all long-term samples and constituted altogether 38 % to 86 % of the total number of sequences in each sample (Table S3). Communities from short-term experiments were different from the long-term ones, comprising 6 highly abundant OTUs that were rare to absent in long-term deployments (Figure 2; Table S3).

Comparison among bacterial communities

Out of the 24 paired replicates of samples, 21 were grouped together in the UPGMA-based cluster dendrogram based on the Bray-Curtis dissimilarity matrix (Figure 3). The exceptions were two GoC samples (B01 and B04) and one short-term MAR sample (B11), which were nevertheless still within a short distance in the same groups. This clearly indicates congruency among replicates. Samples that had been fixed following two different procedures (ethanol fixation for A-B13_1/2 and deep freezing for A-B13_C) were also on the same branches, indicating that the type of fixation had limited influence on the results. Some groups could be easily distinguished. Both substrates for long-term NDSF samples (A-B05) clustered together. Alfalfa substrates from GoC (A01-A04) and L-S (A08) grouped together; as did wood substrates from GoC (B01-A04). A larger group included samples corresponding to both substrates from MAR and HMMV samples (A-B06 – A-B10). Finally, all short-term samples formed a clearly distant group (A-B11 – A-B13). Interestingly, CHEMECOLIS deployed for different periods of time in the long-term experiment clustered within the same larger groups but do not with each other. These include the GoC Mercator deployments for 289 (A-B01) and 731 days (A-B02), the MAR Rainbow deployments for 328 and 414 days (A-B06 and A-B07), and the HMMV deployments for 388 and 752 days (A-B09 and A-B10). Similar

groupings were found on the NMDS graph (Figure S2).

The influence of factors (substrate type, deployment area) and variables (water temperature, duration of deployment and depth) on the community composition was evaluated by constrained RDA (Figure 4). On the two dimensional graph, clear segregation of samples by region was visible, samples clustering around the centroids representing their region of origin. The influence of the type of substrate was less marked, as centroids representing pine wood and alfalfa were not very distant from one another (Figure 4). Variables were represented as three vectors with their lengths proportional to the variance explained. Samples from MAR were for example aligned parallel to the vector 'DAYS', starting from the upper left corner of the graph (short term deployments). The model overall explained 38% of the total variance. The deployment region accounted for 21% of the variance; days, substrate, and depth between 5 to 4%; and the water temperature was responsible for less than 4% of the total variance (Table S4). The ANOVA test confirmed that all factors and variables were statistically significant, based on permutation tests ($p<0.001$) (Table S4).

Identification and distribution of bacteria related to chemosynthetic symbionts

A total of 24296 reads within 38 OTUs had the 'symbio' keyword in at least one of their four best blast hit definitions (7.3% of the Dataset_3). Putatively related symbionts were distributed within 8 potential metazoan host families. Above 22000 belonged to relatives of symbionts associated with *Rimicaris* shrimps, *Idas* mussels and *Lyrodus* shipworms (data not shown). A phylogenetic tree was computed using representative sequences of potential symbiont OTU and sequences of known symbionts from public databases (Figure S3). Only the OTUs displaying a symbiont sequence as their closest relative were retained as potential candidates for free-living forms of symbionts (Table S5). We obtained 21301 sequences representing 17 OTUs related to symbionts (Table S5). OTUs related to *Rimicaris*–associated Epsilonproteobacteria represented 9665 reads, followed by *Idas*-associated Symbiont G and Bacteroidetes (7052 and 2558), and *Lyrodus* symbionts-related OTUs (1392). Relatives of bacteria associated with Siboglinidae polychaetes (505), Lucinidae bivalves (93), and *Idas*-associated sulfur oxidizers (36) were far less abundant (Table S5). The *Rimicaris* symbiont-related OTUs were highly abundant in short-term deployments in MAR, very rare in EM and GoC, and absent everywhere else. Relatives of *Idas* Bacteroidetes and Symbiont G, and of Siboglinidae symbionts were ubiquitous (GoC, EM, MAR, HMMV). Those of *Lyrodus* and Lucinidae symbionts were present only in EM and GoC, and those of *Idas*-associated sulfur oxidizers only in GoC. The occurrence of symbiont-related OTUs was related to the host

presence in the corresponding regions (Table 3). Shrimps and their symbionts co-occured in MAR (WoRMS Website), with only few symbiont related sequences in GoC and EM. Lucinids (Taylor *et al.*, 2014) and their symbionts co-occurred in GoC and EM, while they were absent in MAR and HMMV. Symbionts of *Idas* mussels and siboglinids were present in all regions, while the hosts were absent at HMMV (Duperron *et al.*, 2013) and MAR (World Polychaeta Database Website) respectively. Symbionts of teredinids could be detected mainly in GoC, with few sequences in EM, while *Lyrodus* shipworms occur only in shallow coastal waters (Borges *et al.*, 2014).

Discussion

Methodology

Over the last few years, 454 pyrosequencing has become a standard in the analyses of microbial communities (Margulies *et al.*, 2005). Numerous studies used massive parallel sequencing techniques to describe the microbial communities in various deep-sea habitats (Sogin *et al.*, 2006, Huber *et al.*, 2007). Sets of criteria for sequence processing, in order to eliminate low quality data by analyzing the distribution of the types of potential errors, and appropriate clustering methods are now implemented in various software (Caporaso *et al.*, 2010; Huse *et al.*, 2007; Kunin *et al.*, 2010; Huse *et al.*, 2010; Quince *et al.*, 2009, 2011; Schloss *et al.*, 2009, 2011). In this study we used the denoising algorithms of AmpliconNoise based on sequence clustering approaches because they correctly estimate OTU diversities, compared to those observed by morphological studies (for protists) and clone libraries analyses (Bachy *et al.*, 2013). All CHEMECOLI samples were analyzed in duplicates. Estimated diversity and richness indices of most duplicates were comparable, save for two exceptions in which Chao1 and ACE indices varied 5 to 9-fold between replicates for a long-term sample from GoC and for short-term one from MAR. These two exceptions emphasize the need for sample replication. The UPGMA dendrograms evidenced the very short distances between most replicated samples. Similar groupings were observed on the RDA (Figure 4) graph, in which replicates were most often in very close vicinity to each other. Finally, high similarity was observed between samples stored in 96% ethanol and deep frozen at -80 °C. Ethanol treatment is thus an appropriate method for sample storage and conservation in view of the difficult conditions experienced sometimes on board and during shipment. Altogether lack of evident contamination, homogeneity between replicates, and use of appropriate 'de-noising' procedures indicate good quality of the sequence dataset.

Bacterial colonization of pine wood and alfalfa substrates in deep sea chemosynthesis-based ecosystems

Bacterial communities colonizing alfalfa were usually more diverse than those colonizing wood samples (Figure S1A-B; Table 2). This is not unexpected because wood displays high content of lignin, which consists in refractory hydrophobic polymers harder to degrade than cellulose, and because alfalfa offers greater surface per volume for bacterial colonization. The overall OTU diversity in short-term deployments was lower than in samples deployed for more than 289 days. After 289 days, no correlation was observed between community richness and deployment duration (data not shown), suggesting that diversity may have reached saturation sometime in between 14 and 289 days. Short-term samples were usually recovered during distinct legs of the same cruise, while long-terms samples were recovered during follow-up cruises, which occurred on a yearly basis, explaining the lack of intermediate deployment times. These would however be crucial to understand how fast saturation is reached.

The bacterial community in long-term samples included only 10 bacterial subdivisions (Figure 1). Three of them (Alpha-, Delta- and Gammaproteobacteria) were over-represented if compared to others, as shown before (Fagervold *et al.*, 2012, 2013; Bienhold *et al.*, 2013). Among the most dominant OTUs were members of the Oceanospirillales and Alteromonadales, facultative anaerobe growing on cellobiose and previously found on sunken wood (Fagervold *et al.*, 2012). Within the Deltaproteobacteria, OTUs related to Mycococcales and Desulfobacteriales, and two groups of SRBs detected by Bienhold *et al.* (2013), were identified. Finally, Bacteriodetes were found. These are often chemoorganotrophs specialized in degrading various biopolymers such as cellulose (Kirchman, 2002). The composition of short-term communities was different, and except for the wood sample from M-G, were dominated by Gammaproteobacteria. This is comparable with the 1-day deployment control sample in Bienhold's study (2013). Epsilonproteobacteria were over-represented in the short-term M-G wood sample thanks to the high abundance of *Rimicaris exoculata* ectosymbiont, which is discussed below. The abundance of Epsilonproteobacteria is consistent with their dominance at seep and vent ecosystems and their documented quick colonization of newly formed habitats including wood (López-García *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2010; Fagervold *et al.*, 2012, 2013; Bienhold *et al.*, 2013).

Major factors influencing the microbial community composition

The RDA explains less than 40% of the total variance observed in the community

composition. It means that other factors and variables, likely including environmental parameters not measured during sampling, play a major role. These are hard to obtain because only time-series acquired in the immediate vicinity of CHEMECOLIs and over the course of the experiment would make sense. Nevertheless, physico-chemical data could explain another significant fraction of the total variance (Lee *et al.*, 2014). Among factors considered here, the deployment area contributed 21% of the variance. This is evident from the UPGMA, NMDS and RDA graphs which cluster samples according to their area of origin, with few exceptions (*i.e.* L-S sample A-B08). EM samples are grouped and GoC alfalfa and wood samples build two rather distinct groups. Interestingly, MAR and HMMV samples appear more entangled. This suggests that communities from vent MAR and cold seep HMMV deployments are less distinct, despite the great geographical distance and very different latitudes. This observation reminds of a previous study in which deep ocean microbial communities from poles and low latitudes differed less than corresponding samples from the euphotic surface waters (Ghiglione *et al.*, 2012). Other factors and variables each contribute 5% or less to the variance. The fact that substrate does not explain much variance is probably due to the similar composition of alfalfa and wood, both being plant-derived material. The consequence is that although alfalfa communities are more diverse, the most abundant OTUs tend to be shared. More caution is needed when looking at other variables. Duration of deployment for example only explains 5% of the total variance, yet short-term samples are remarkably less diverse and cluster very far from long-term samples in the various analyses. This apparent lack of congruency is clearly due to a sampling bias. The experimental design with regards to this variable is highly skewed, short-term samples (10 to 13 days) represented only 5 of the 25 deployed CHEMECOLIs, the others being deployed for 289 to 1112 days, and having possibly already reached diversity saturation. Long-term CHEMECOLIS deployed at the same site for different durations do not display the most similar communities, but still their communities resemble each other, suggesting a certain level of stability at this stage. If we had better coverage of intermediate times and a more balanced design, duration of deployment would certainly be a major explanatory factor (Palacios *et al.*, 2009; Fagervold *et al.*, 2012). Although the temperature variable is well equilibrated with 7 sites displaying typical deep sea temperatures (2-4.6°C) against 6 others ranging from 10°C to 13°C, it explains less than 4% of the total variance. Depths cover a broad bathymetric range (354 to 2300m) and samples are distributed rather homogeneously, yet it explains only 4% of the variance. Depth is usually not considered a major factor in the aphotic zone of the ocean (Fagervold *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). Neither latitude nor water temperature showed

significant correlations with estimated microbial diversities in the previous large scale study by Ghiglione (2012). Overall, the geographical area of deployment seems to be the most important factor influencing the microbial colonization in this study. The effect of the immersion time is certainly underestimated here because of lack of intermediate-term samples. Both substrates share similar bacteria and these communities become saturated in term of both diversity and composition between 14 and 289 days after deployment. For longer periods, bacterial composition appears to be relatively stable, as samples from the same sites group together. Only marine microbes colonize both substrates in CHEMECOLIs, no typical contaminants could be detected. The bacterial taxonomic composition identified in colonization devices compared to other studies (Fagervold *et al.*, 2012, 2013; Bienhold *et al.*, 2013) confirms that the degradation of organic matter starts to take place within a very short time after immersion.

Colonization of substrates by symbiont-related bacteria

The sequence dataset was screened for sequences related to chemosynthetic symbionts of metazoans. We retained only the closest relatives of symbiotic bacteria as reasonably supported candidates, despite that the short length of reads hampers the quality of phylogenetic reconstruction. Almost 70% of symbiont-related sequences were found on pine wood (Table S1). The higher diversity within alfalfa samples may indeed "dilute" symbiont-related sequences in higher numbers of other bacterial OTUs, making their discovery less likely. Putative free-living forms of symbionts or symbiont-related bacteria from five host metazoan families were identified. The most abundants were related to Epsilonproteobacteria ectosymbionts of *Rimicaris exoculata*. In this species, bacteria quickly re-colonize the shrimp's gill chamber after each molt, estimated to occur every 10 days (Zbinden *et al.*, 2004; Corbari *et al.*, 2008). Our results are in good agreement with this constraint. Shrimp symbiont-related OTUs were indeed the most abundant in the short-term MAR samples (10-14 days), and absent from all long-term deployments. They thus seem to be pioneer and efficient colonizers of available surfaces at vents. This questions the specificity of the symbiotic association. It may well be that bacteria behave as opportunists colonizing the new cuticle when it appears, as they would colonize any surface. The moult cycle would favour iterative colonization by the same bacteria simply by renewing the surface available every few weeks.

Relatives of gill endosymbionts of the mytilid *Idas* sp. were also abundant, mostly the Symbiont-G group and the Bacteroidetes, two symbiont groups which were recently

discovered in species from the eastern Mediterranean and the Gulf of Cadiz (Duperron *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2013). The usual sulfur-oxidizers are much rarer, though a few were found. Finding free-living relatives of mussel symbionts was not unexpected, given that environmental acquisition of symbionts is supported in *Idas modiolaeformis* based on the absence of bacteria within gonads and gametes (Gaudron *et al.*, 2012). In a recent study, Laming *et al.* (2014) showed that environmental symbiont acquisition took place at the early juvenile stage, after settlement.

The occurrence of *Lyrodus* and *Osedax* symbionts-related OTUs was more unexpected in our samples, as shipworms live in shallow coastal waters (Borges *et al.*, 2014) and *Osedax* is a bone-eating specialist (Rouse *et al.*, 2004; Glover *et al.*, 2005). *Lyrodus* gill endosymbionts have been proposed to produce cellulolytic enzymes that contribute to the host's ability to digest wood (Waterbury *et al.*, 1983), and multiple bacterial phylotypes can co-occur in its gill bacteriocytes (Distel *et al.*, 2002). Although the *Lyrodus pedicellatus* symbiont transmission mode remains still unknown, vertical transmission has been evidenced for its relative *Bankia setacea* (Sipe *et al.*, 2000). But others wood-eating bivalves (*Xylophaga* spp. and *Xyloredo* spp.) were abundant in most samples and although we carefully avoided processing any animal tissue in our analyses, we cannot rule out that some bacterial symbionts were released during dissection or processing. Knowing that Bienhold *et al.* (2013) suggested a close phylogenetic relationship between symbionts of the shallow and deep-sea wood-boring bivalves we cannot objectively conclude whether the identified OTUs are actually free-living forms of *Lyrodus pedicellatus* or *Xylophaga* spp. symbionts. Presence of an OTU related to lucinid clams symbionts, for which an environmental transmission mode has been well documented (Gros *et al.*, 1996), is not surprising although less than 100 sequences were found in our dataset.

Symbiont transmission and colonization

All symbiont-related OTUs corresponded to environmentally-transmitted bacteria. The existence of free-living forms is thus expected, although their natural habitat is not documented (Gros *et al.*, 1996; Harmer *et al.*, 2008). Symbiont-related sequences were quite frequent in a few samples, and some were present on several sites. The abundance of symbionts on short-term wood samples indicates that they are probably efficient colonizers, although little is known about the mechanism of symbiont acquisition from the environment. The *Idas* sp. symbiont-G related-OTUs were on the other hand found in moderate numbers, but in almost all samples. Most of symbionts detected shared the same distribution pattern as

their hosts (Table 3). An exception was the shipworms' symbiont in GoC and in EM, while their host occurs only in coastal shallow waters (Borges *et al.*, 2014), but this may be because of close relatedness with symbionts of *Xylophaga* spp. which are present. We also did not expect the occurrence of Siboglinidae polychaetes symbionts on MAR, nor those of *Idas* sp. in HMMV. The detection of unexpected symbiont-related phylotypes fuels the debate on the connectivity between different deep-sea sites (Vrijenhoek, 2010). Moreover, it confirms that short- and long-term colonization devices and high-throughput sequencing are good tools to further investigate the habitat and densities of free-living relatives of the symbionts.

The next step will be to distinguish between free-living close relatives of symbionts and true free-living forms of symbionts, but this will be tricky. Symbiont-specific fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probes may not be able to properly discriminate, and low abundances of free living relatives may difficult their detection and quantification on substrata, which show a high level of background autofluorescence (data not shown). Finally, the analyzed hypervariable region of 16S rRNA seems to be too short to be a good target for highly specific probes. Standardized devices are currently being deployed in other geographical regions and in other habitats. There is a high potential to improve the protocol we applied in our study with the increasing length of pyrosequencing reads, thus making the identification of microbes more reliable. For better understanding of the influence of environment on the microbial communities, the chemistry of water should be monitored precisely in the proximity of our colonization devices.

Acknowledgments

We thank captains, crew and chief scientists of RV's, *Pourquoi pas?*, *Meteor*, *Atalante*, *Polarstern*, *James Cook, Pelagia and Belgica* and teams operating ROVs *Victor 6000 (Ifremer, France)*, *Quest 4000 (MARUM, Bremen, Germany)* and submersible *Nautile (Ifremer, France)* and also people on board from all cruises participating in the deployment and recovery of CHEMECOLIs. We thank Françoise Gaill who initiated the CHEMECO EuroDEEP ESF program. This research was supported by UPMC, ANR DeepOases, CHEMECO EuroDEEP ESF, GDR DIWOOD, ITN Symbiomics and in Portugal by European funds (COMPETE) and by national funds through the Portuguese Science Foundation (FCT-EURODEEP/0001/2007 and FCT-PEst-C/MAR/LA0017/2013). Kamil Szafranski was funded through a Ph.D. grant from the Marie Curie Actions Initial Training Network (ITN) SYMBIOMICS (contract number 264774).

Supplementary information is available at ISME Journal's website.

The authors have declared that no competing interests exist.

References

Aida M, Kanemori M, Kubota N, Matada M, Sasayama Y, Fukumori Y. (2008). Distribution and Population of Free-Living Cells Related to Endosymbiont A Harbored in *Oligobrachia mashikoi* (a Siboglinid Polychaete) Inhabiting Tsukumo Bay. *Microbes Environ* **23**:81–88.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389–3402.

Bachy C, Dolan JR, López-García P, Deschamps P, Moreira D. (2013). Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *ISME J* **7**:244–255.

Baco AR, Smith CR. (2003). High species richness in deep-sea chemoautotrophic whale skeleton communities. *Mar Ecol Prog Ser* **260**:109–114.

Bennett B, Smith C, Glaser B, Maybaum H. (1994). Faunal Community Structure of a Chemoautotrophic Assemblage on Whale Bones in the Deep Northeast Pacific-Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* **108**:205–223.

Bienhold C, Pop Ristova P, Wenzhöfer F, Dittmar T, Boetius A. (2013). How Deep-Sea Wood Falls Sustain Chemosynthetic Life Kirchman, DL (ed). *PLoS ONE* **8**:e53590.

Borges LM, Merckelbach LM, Sampaio Í, Cragg SM. (2014). Diversity, environmental requirements, and biogeography of bivalve wood-borers (Teredinidae) in European coastal waters. *Front Zool* **11**:13.

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

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**:335–336.

Corbari L, Zbinden M, CambonBonavita M, Gaill F, Compre 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.

Cunha MR, Rodrigues CF, Génio L, Hilário A, Ravara A, Pfannkuche O. (2013). Macrofaunal assemblages from mud volcanoes in the Gulf of Cadiz: abundance, biodiversity and diversity partitioning across spatial scales. *Biogeosciences* **10**:2553–2568.

Distel DL, Beaudoin DJ, Morrill W. (2002). Coexistence of Multiple Proteobacterial Endosymbionts in the Gills of the Wood-Boring Bivalve *Lyrodus pedicellatus* (Bivalvia: Teredinidae). *Appl Environ Microbiol* **68**:6292–6299.

Distel DL, Roberts SJ. (1997). Bacterial endosymbionts in the gills of the deep-sea wood-boring bivalves *Xylophaga atlantica* and *Xylophaga washingtona*. *Biol Bull* **192**:253–261.

Van Dover C. (2000). The ecology of deep-sea hydrothermal vents. Princeton University Press: Princeton, N.J.

Doyle J, Doyle J. (1987). Isolation of DNA from fresh plant tissue. *Focus* **12**:13–15.

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

Duperron S, Gaudron SM, Rodrigues CF, Cunha MR, Decker C, Olu K. (2013). An overview of chemosynthetic symbioses in bivalves from the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **10**:3241–3267.

Duperron S, Laurent MCZ, Gaill F, Gros O. (2008). Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of Mytilidae associated with wood falls. *Fems Microbiol Ecol* **63**:338–349.

Fagervold SK, Bessette S, Romano C, Martin D, Plyuscheva M, Le Bris N, *et al.* (2013). Microbial communities associated with the degradation of oak wood in the Blanes submarine canyon and its adjacent open slope (NW Mediterranean). *Prog Oceanogr* **118**:137–143.

Fagervold SK, Galand PE, Zbinden M, Gaill F, Lebaron P, Palacios C. (2012). Sunken woods on the ocean floor provide diverse specialized habitats for microorganisms. *Fems Microbiol Ecol* **82**:616–628.

Gaudron SM, Demoyencourt E, Duperron S. (2012). Reproductive Traits of the Cold-Seep Symbiotic Mussel *Idas modiolaeformis*: Gametogenesis and Larval Biology. *Biol Bull* **222**:6–16.

Gaudron SM, Pradillon F, Pailleret M, Duperron S, Le Bris N, Gaill F. (2010). Colonization of organic substrates deployed in deep-sea reducing habitats by symbiotic species and associated fauna. *Mar Env Res* **70**:1–12.

Ghiglione J-F, Galand PE, Pommier T, Pedrós-Alió C, Maas EW, Bakker K, *et al.* (2012). Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci* **109**:17633–17638.

Glover AG, Kallstrom B, Smith CR, Dahlgren TG. (2005). World-wide whale worms? A new species of *Osedax* from the shallow north Atlantic. *Proc R Soc B Biol Sci* **272**:2587–2592.

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

Gros O, Liberge M, Heddi A, Khatchadourian C, Felbeck H. (2003). Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (Thalassia testudinum environment). *Appl Environ Microbiol* **69**:6264–6267.

Harmer TL, Rotjan RD, Nussbaumer AD, Bright M, Ng AW, DeChaine EG, *et al.* (2008). Free-Living Tube Worm Endosymbionts Found at Deep-Sea Vents. *Appl Environ Microbiol* **74**:3895–3898.

Huber JA, Cantin HV, Huse SM, Welch DB, Sogin ML, Butterfield DA. (2010). Isolated communities of Epsilonproteobacteria in hydrothermal vent fluids of the Mariana Arc seamounts. *FEMS Microbiol Ecol* **73**:538–549.

Huber JA, Welch DBM, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, *et al.* (2007). Microbial Population Structures in the Deep Marine Biosphere. *Science* **318**:97–100.

Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch D. (2007). Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol* **8**:R143.

Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* **12**:1889–1898.

Kirchman DL. (2002). The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* **39**:91–100.

Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* **12**:118–123.

Laming SR, Duperron S, Cunha MR, Gaudron SM. (2014). Settled, symbiotic, then sexually mature: adaptive developmental anatomy in the deep-sea, chemosymbiotic mussel *Idas modiolaeformis*. *Mar Biol* **161**:1319–1333.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinforma Oxf Engl* **23**:2947–2948.

Laurent MCZ, Le Bris N, Gaill F, Gros O. (2013). Dynamics of wood fall colonization in relation to sulfide concentration in a mangrove swamp. *Mar Environ Res* **87–88**:85–95.

Laurent MCZ, Gros O, Brulport J-P, Gaill F, Le Bris N. (2009). Sunken wood habitat for thiotrophic symbiosis in mangrove swamps. *Mar Environ Res* **67**:83–88.

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

Lee OO, Wang Y, Tian R, Zhang W, Shek CS, Bougouffa S, *et al.* (2014). *In situ* environment rather than substrate type dictates microbial community structure of biofilms in a cold seep system. *Sci Rep* **4**. Article number: 3587.

Legendre P, Gallagher ED. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* **129**:271–280.

Leschine SB. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu Rev Microbiol* **49**:399–426.

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

Lorion J, Duperron S, Gros O, Cruaud C, Samadi S. (2009). Several deep-sea mussels and their associated symbionts are able to live both on wood and on whale falls. *Proc R Soc B-*

Biol Sci **276**:177–185.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, *et al.* (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**:376–380.

McFall-Ngai MJ. (2000). Negotiations between animals and bacteria: the 'diplomacy' of the squid-vibrio symbiosis. *Comp Biochem Physiol -Mol Integr Physiol* **126**:471–480.

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

Palacios C, Zbinden M, Baco AR, Treude T, Smith CR, Gaill F, *et al.* (2006). Microbial ecology of deep-sea sunken wood: quantitative measurements of bacterial biomass and cellulolytic activities. *Cah Biol Mar* **47**:415–420.

Palacios C, Zbinden M, Pailleret M, Gaill F, Lebaron P. (2009). Highly Similar Prokaryotic Communities of Sunken Wood at Shallow and Deep-Sea Sites Across the Oceans. *Microb Ecol* **58**:737–752.

Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO. (2012). SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**:1823–1829.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, *et al.* (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**:D590–596.

Quince C, Lanzén A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, *et al.* (2009). Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Methods* **6**:639–641.

Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ. (2011). Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *BMC Bioinformatics* **12**:38.

R Development Core Team. (2013). R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

Rodrigues CF, Cunha MR, Génio L, Duperron S. (2013). A complex picture of associations between two host mussels and symbiotic bacteria in the Northeast Atlantic. *Naturwissenschaften* **100**:21–31.

Rouse GW, Goffredi SK, Vrijenhoek RC. (2004). *Osedax*: Bone-Eating Marine Worms with Dwarf Males. *Science* **305**:668–671.

Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. (2011). Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *Plos One* **6**:e27310.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, *et al.* (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **75**:7537–7541.

Sipe AR, Wilbur AE, Cary SC. (2000). Bacterial Symbiont Transmission in the Wood-Boring

Shipworm *Bankia setacea* (Bivalvia: Teredinidae). *Appl Environ Microbiol* **66**:1685–1691.

Smith CR, Baco AR. (2003). Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanogr Mar Biol* **41**:311–354.

Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, *et al.* (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere' RID B-1226-2008. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12115–12120.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**:2725–2729.

Taylor JD, Glover EA, Williams ST. (2014). Diversification of chemosymbiotic bivalves: origins and relationships of deeper water Lucinidae. *Biol J Linn Soc* **111**:401–420.

Treude T, Smith CR, Wenzöhfer F, Carney E, Bernardino AF, Hannides AK, *et al.* (2009). Biogeochemistry of a deep-sea whale fall: sulfate reduction, sulfide efflux and methanogenesis. *Mar Ecol Prog Ser* **382**:1–21.

Turner RD. (1973). Wood-Boring Bivalves, Opportunistic Species in the Deep Sea. *Science* **180**:1377–1379.

Vrijenhoek RC. (2010). Genetic diversity and connectivity of deep-sea hydrothermal vent metapopulations. *Mol Ecol* **19**:4391–4411.

Waterbury JB, Calloway CB, Turner RD. (1983). A cellulolytic nitrogen-fixing bacterium cultured from the gland of deshayes in shipworms (bivalvia: teredinidae). *Science* **221**:1401–1403.

Wolff T. (1979). Macrofaunal Utilization of Plant Remains in the Deep-Sea. *Sarsia* **64**:117–136.

Won YJ, Hallam SJ, O'Mullan GD, Pan IL, Buck KR, Vrijenhoek RC. (2003). Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Appl Environ Microbiol* **69**:6785–6792.

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

Zhu D, Tanabe S-H, Yang C, Zhang W, Sun J. (2013). Bacterial Community Composition of South China Sea Sediments through Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *Plos One* **8**:e78501.

Figures

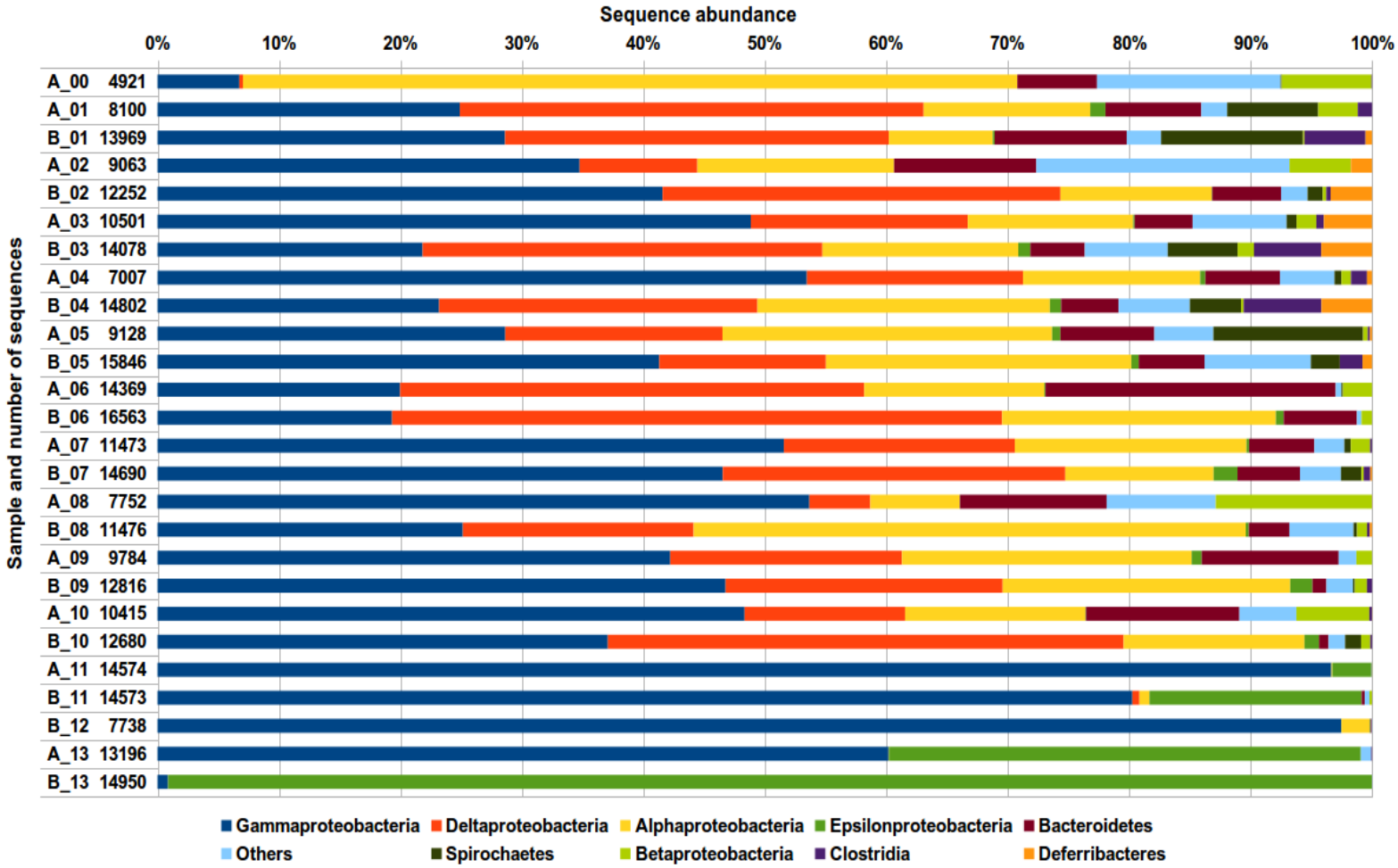


Figure 5-1: Figure 1: Composition of bacterial communities at the division or sub-division level based the on V5-V6 region of 16S rDNA gene sequences (OTU identity threshold at 97%). Please refer to Table 5-1 for sample IDs. Abundances are indicated as percentage of total sequences in each sample (numbers close to sample ID's).

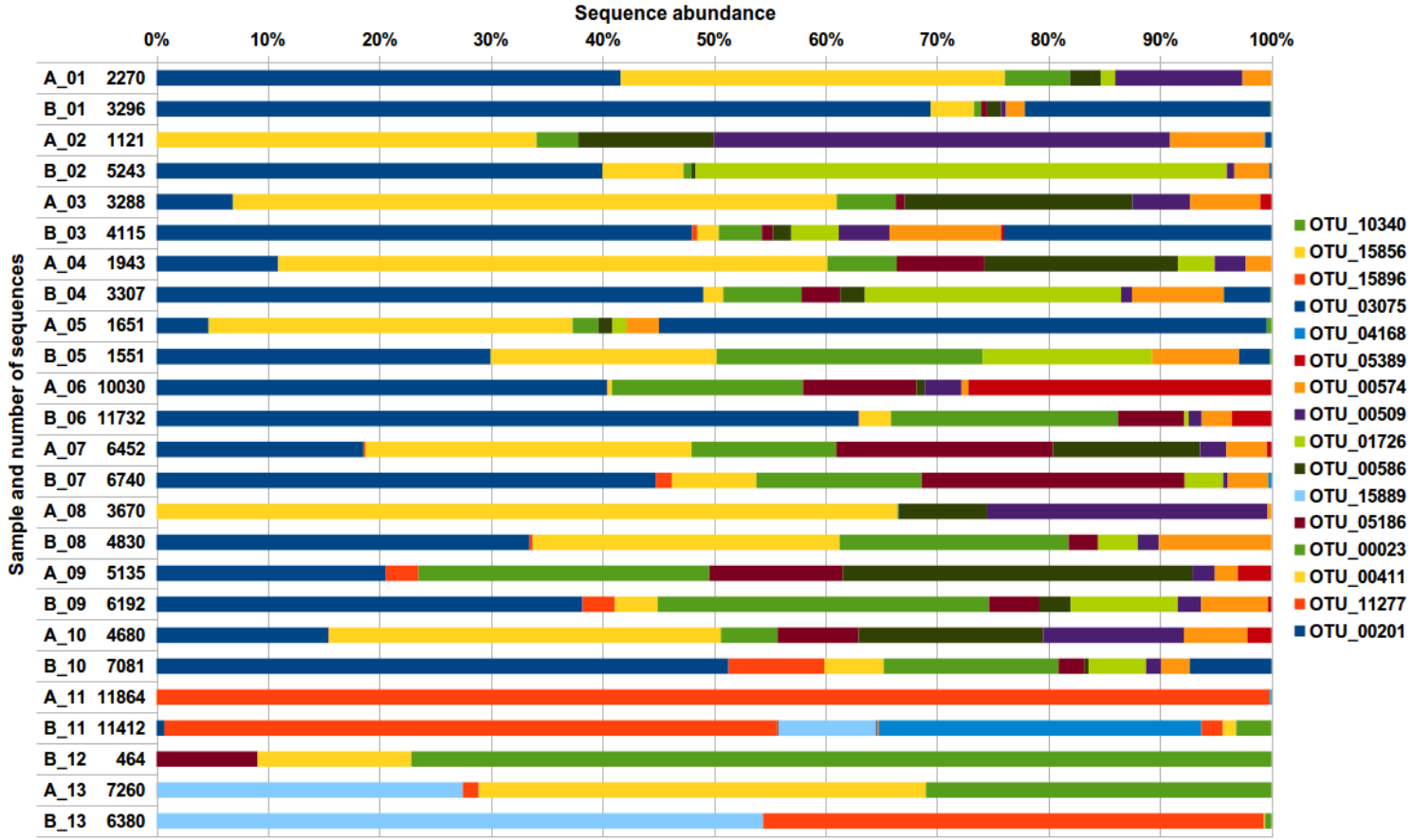


Figure 5-2: Figure 2: Percentage of pyrosequencing reads representing the most abundant OTUs (more than 1% of the total number of sequences, i.e. > 3000 reads) and assigned to different bacterial phylotypes. Taxonomic classification was based on comparison of sequences within the SILVA database with OTU identity threshold at 97%. More details on taxonomic assignment of OTU analyzed are provided in Table S3. Refer to Table 5-1 for sample ID.

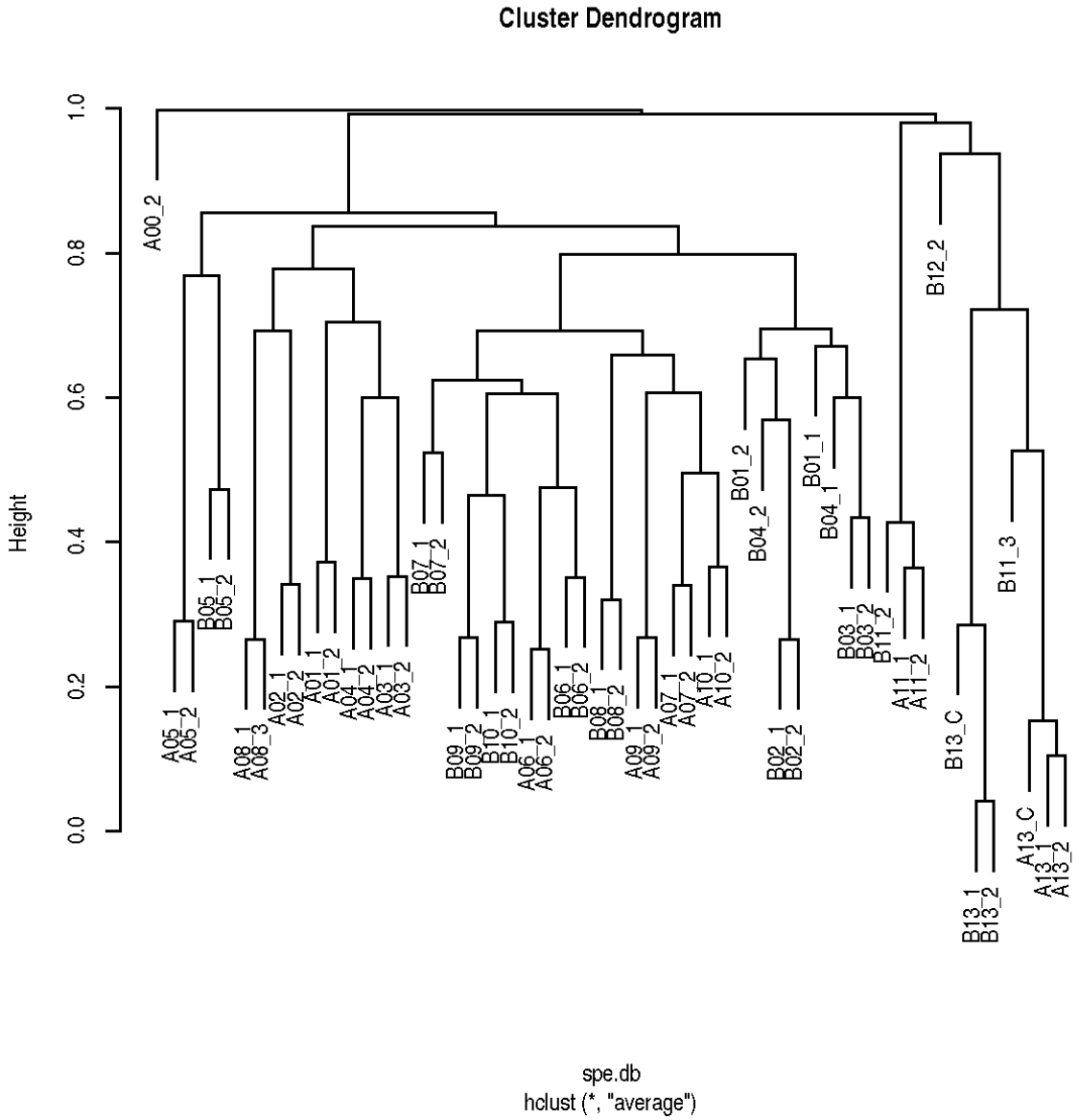


Figure 5-3: Figure 3: Dendrogram for average agglomerative clustering generated in R (R Development Core Team, 2013) using Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Average (UPGMA) on a Bray-Curtis distance matrix ('hclust()' function in stats package). The dendrogram is rooted on the negative alfalfa control (A00). Sample IDs are described in Table 5-1.

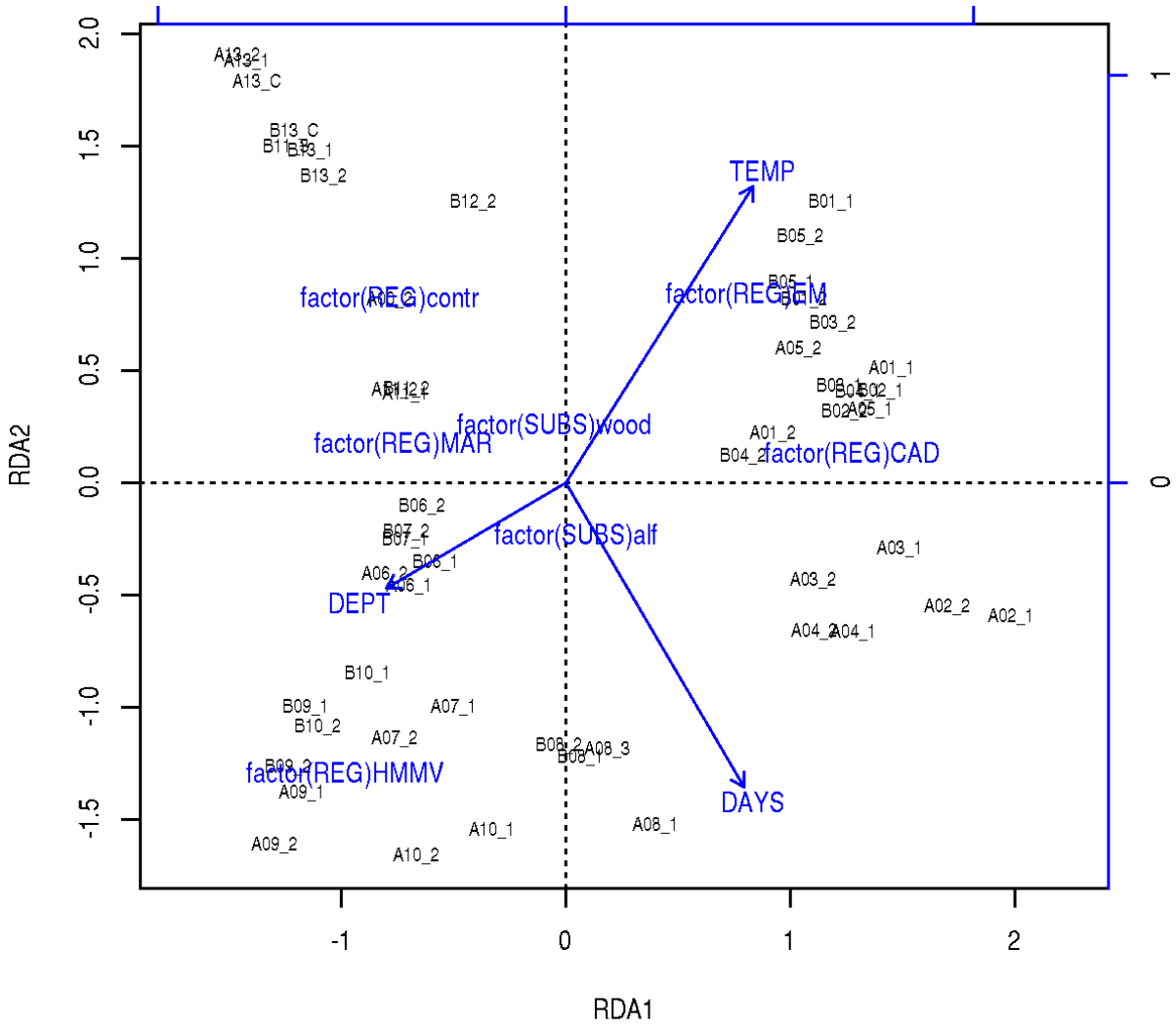


Figure 5-4: Figure 4: RDA biplot of the Hellinger-transformed OTU abundance data constrained by all environmental variables, scaling 3. Substrate type (factor(SUBS)) and region (factor(REG)) were used as factors and water temperature (TEMP), depth (DEPT) and deployment time (DAYS) were used as variables into the constrained RDA, generated in R using 'rda()' and 'plot()' functions in 'vegan' package. Sample IDs and environmental variables and factors are described in Table 5-1. The influence of each variable and factor and their significance were assessed using ANOVA permutation tests – details in Table S4.

Tables

Alfalfa	Wood	Region	Site	Depth	Days	Temperature	Site localisation		Deployment date	Cruise	Recovery date	Cruise
A0	**B0**	negative control										
A1	**B1**	GoC	Mercator	354m	289	12	35° 17.916'N	6° 38.709'W	19/05/2007	JC10	03/03/2008	64PE284
A2	**B2**	GoC	Mercator	354m	731	12	35° 17.916'N	6° 38.709'W	19/05/2007	JC10	19/05/2009	Belgica cruise ST0914
A3	**B3**	GoC	Meknes	698m	445	11	34° 59.09'N	7° 04.42'W	01/03/2008	64PE284	20/05/2009	Belgica cruise ST0914
A4	**B4**	GoC	Darwin	1110m	729	10	35° 23.523'N	7° 11.513'W	21/05/2007	JC10	19/05/2009	Belgica cruise ST0914
A5	**B5**	EM	NDSF	1693m	357	13	32° 31.9772'N	30° 21.1779'E	18/11/2006	Bionil	10/11/2007	Medeco
A6	**B6**	MAR	Rainbow	2300m	328	3,7	36° 13.766'N	33° 54.192'W	21/08/2006	Momareto	15/07/2007	Momardream
A7	**B7**	MAR	Rainbow	2279m	414	3,7	36° 13.7454'N	33° 54.0513'W	14/07/2007	Momardream	31/08/2008	MOMAR08
A8	**B8**	MAR	Lucky Strike	1696m	1112	4,6	37° 17.339'N	32° 16.533'W	04/09/2006	Momareto	20/09/2009	Bathyluck
A9	**B9**	HMMV	HMMV	1257m	388	2	72° 00.1443'N	14° 43.2282'E	06/06/2006	Vicking	29/06/2007	ARK XXII/1b
A10	**B10**	HMMV	HMMV	1257m	752	2	72° 00.3390'N	14° 43.2209'E	03/07/2007	ARK XXII/1b	24/07/2009	ARKXXIV/2
A11	**B11**	MAR	Rainbow	2275m	10	3,7	36° 13.7553'N	33° 54.11'W	31/08/2008	MOMAR08	10/09/2008	MOMAR08
-	**B12**	EM	NDSF	1697m	14	13	32° 31.993'N	30° 21.193'E	04/11/2006	Bionil	18/11/2006	Bionil
A13	**B13**	MAR	Menez Gwen	860 m	13	4	37° 50.6786'N	31° 31.1493'W	05/08/2013	BioBaz	18/08/2013	BioBaz

Tableau 5-1: Table 1: Main characteristics of samples used for sequence analyses. Environmental data for each site were used in redundancy analysis (RDA).

Threshold		Index			
0,03		richness		diversity	
Sample	Sobs	Chao1	ACE	Shannon	Invsimpson
nb_seq	4543				
A00_2	279,11	526,96	733,44	3,39	11,18
A01_1	1196,32	2784,75	4440,27	5,64	52,92
A01_2	899,13	2002,70	3446,10	4,99	28,71
A02_1	589,27	851,89	912,04	5,22	85,76
A02_2	1678,54	4108,65	7117,76	6,39	158,41
A03_1	740,86	1558,90	2554,81	4,90	40,70
A03_2	1108,94	2297,72	3608,17	5,30	32,70
A04_1	1265,55	2957,10	5319,83	5,71	65,85
A04_2	1396,16	3102,94	4999,33	5,90	73,61
A05_1	916,56	1984,98	3157,16	5,23	45,95
A05_2	1058,51	2370,38	3736,46	5,22	35,52
A06_1	154,85	207,59	234,98	3,02	9,74
A06_2	216,49	421,47	617,40	2,69	6,24
A07_1	644,48	1238,09	1883,15	4,42	21,70
A07_2	460,93	969,89	1496,23	4,02	18,40
A08_1	1041,82	2283,52	3766,65	5,20	29,86
A08_3	858,28	2079,23	3740,74	4,41	11,43
A09_1	598,65	1149,13	1601,53	4,37	21,37
A09_2	499,62	862,40	1135,98	4,15	18,58
A10_1	625,12	1315,23	2082,32	4,49	25,48
A10_2	673,01	1283,04	1924,22	4,62	31,34
A11_1	46,91	126,08	192,93	0,81	1,42
A11_2	46,19	102,66	174,43	0,98	1,60
A13_1	276,45	604,08	830,39	3,43	11,72
A13_2	279,00	508,53	852,31	3,43	11,92
A13_C	237,16	503,26	763,51	3,15	9,49
B01_1	282,77	433,37	535,60	4,11	27,14
B01_2	379,09	656,86	900,68	3,84	12,01
B02_1	782,17	1722,28	2878,57	4,61	19,39
B02_2	709,60	1440,33	2247,49	4,39	18,23
B03_1	529,85	1069,75	1658,48	4,53	30,35
B03_2	536,81	1123,29	1637,86	4,71	39,90
B04_1	391,71	714,70	1096,37	4,48	42,43
B04_2	282,05	460,62	510,23	3,67	12,68
B05_1	367,52	636,47	824,42	4,40	39,49
B05_2	408,57	741,91	1013,12	4,48	36,14
B06_1	178,22	308,73	435,47	2,75	5,51
B06_2	97,21	152,68	168,77	2,28	4,06
B07_1	178,81	264,22	308,09	3,62	20,69
B07_2	257,03	439,33	542,02	3,26	8,00
B08_1	691,66	1391,93	2370,47	4,60	28,79
B08_2	580,78	1105,29	1658,46	4,43	25,42
B09_1	291,77	568,01	833,71	3,54	13,81
B09_2	407,70	794,03	1054,50	4,12	20,23
B10_1	347,54	625,72	947,47	3,59	10,12
B10_2	434,71	795,56	1031,26	3,99	13,96
B11_2	77,80	106,13	109,30	1,48	2,54
B11_3	354,33	687,95	995,05	3,65	14,37
B12_2	154,90	266,93	321,80	2,97	10,54
B13_1	139,41	291,52	569,19	2,60	7,75
B13_2	116,56	238,70	383,18	2,43	6,92
B13_C	201,96	442,01	695,70	2,67	6,64

Tableau 5-2: Table 2: Species richness and diversity indices calculated for each sample in Mothur (Schloss *et al.*, 2009) for sequences with OTU identity threshold at 97%. Sample IDs are described in Table 1.

Host family	Region					Total seqs nb	Symbiont occurrence				Host Occurence				Reference
	C-	GoC	EM	MAR	HMMV		GoC	EM	MAR	HMMV	GoC	EM	MAR	HMMV	
Lucinidae	0	64	29	0	0	93	+	+	-	-	+	+	-	-	Taylor *et al.*, 2013
Siboglinidae	0	393	2	80	30	505	+	+/-	+	+	+	+	-	+	World Polychaeta Database Website
Mytilidae	0	2883	185	4769	1809	9646	+	+	+	+	+	+	+	-	Duperron *et al.*, 2013
Teredinidae	0	1378	14	0	0	1392	+	+/-	-	-	-	-	-	-	Borges *et al.*, 2014
Alvinocarididae	0	4	13	9648	0	9665	+/-	+/-	+	-	-	-	+	-	WoRMS Website
Total						21301									

Tableau 5-3: Table 3: Symbionts and animal hosts occurrence in geographical regions analyzed in this study. Symbiont occurrence is a synthesis of data from Table S5, host occurrence is based on available literature study. Sample IDs are described in Table 1.

Figures et tableaux supplémentaires

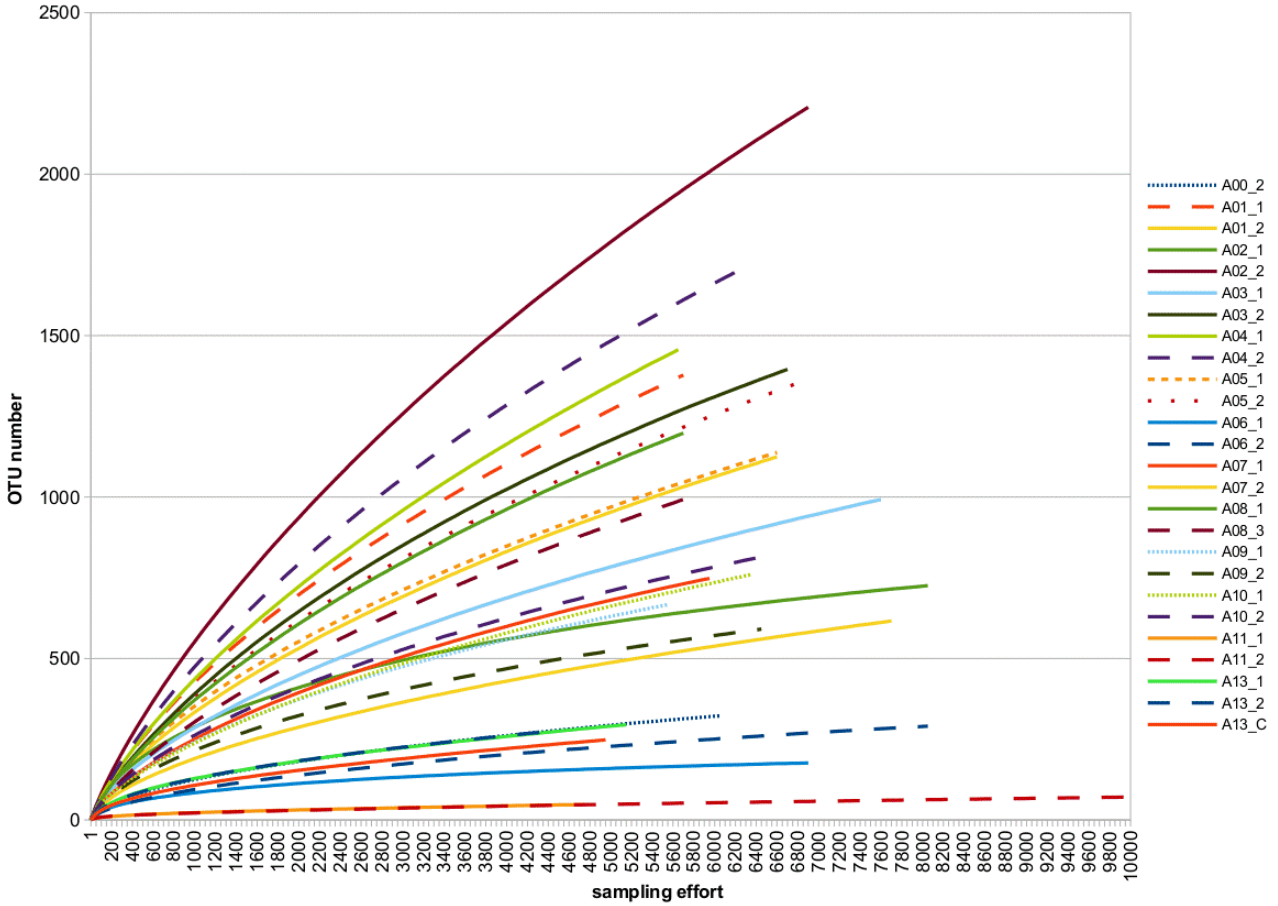


Figure 5-5: Figure S1A: Rarefaction analysis for the alfalfa grass (A) samples. The curves were generated for 97% levels of OTU using Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Sample IDs are described in Table 1.

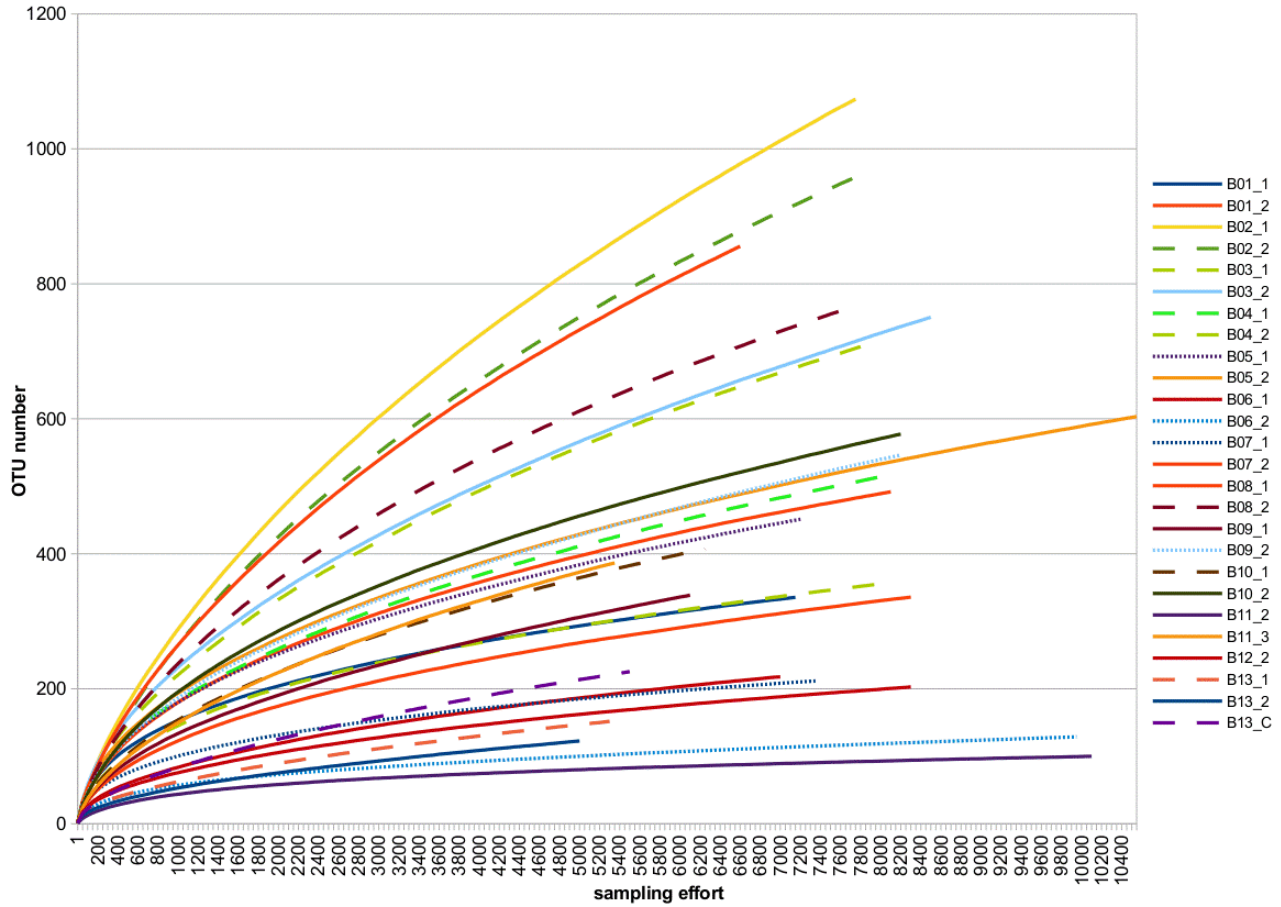


Figure 5-6: Figure S1B: Rarefaction analysis for the pine wood (B) samples. The curves were generated for 97% levels of OTU using Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Sample IDs are described in Table 1.

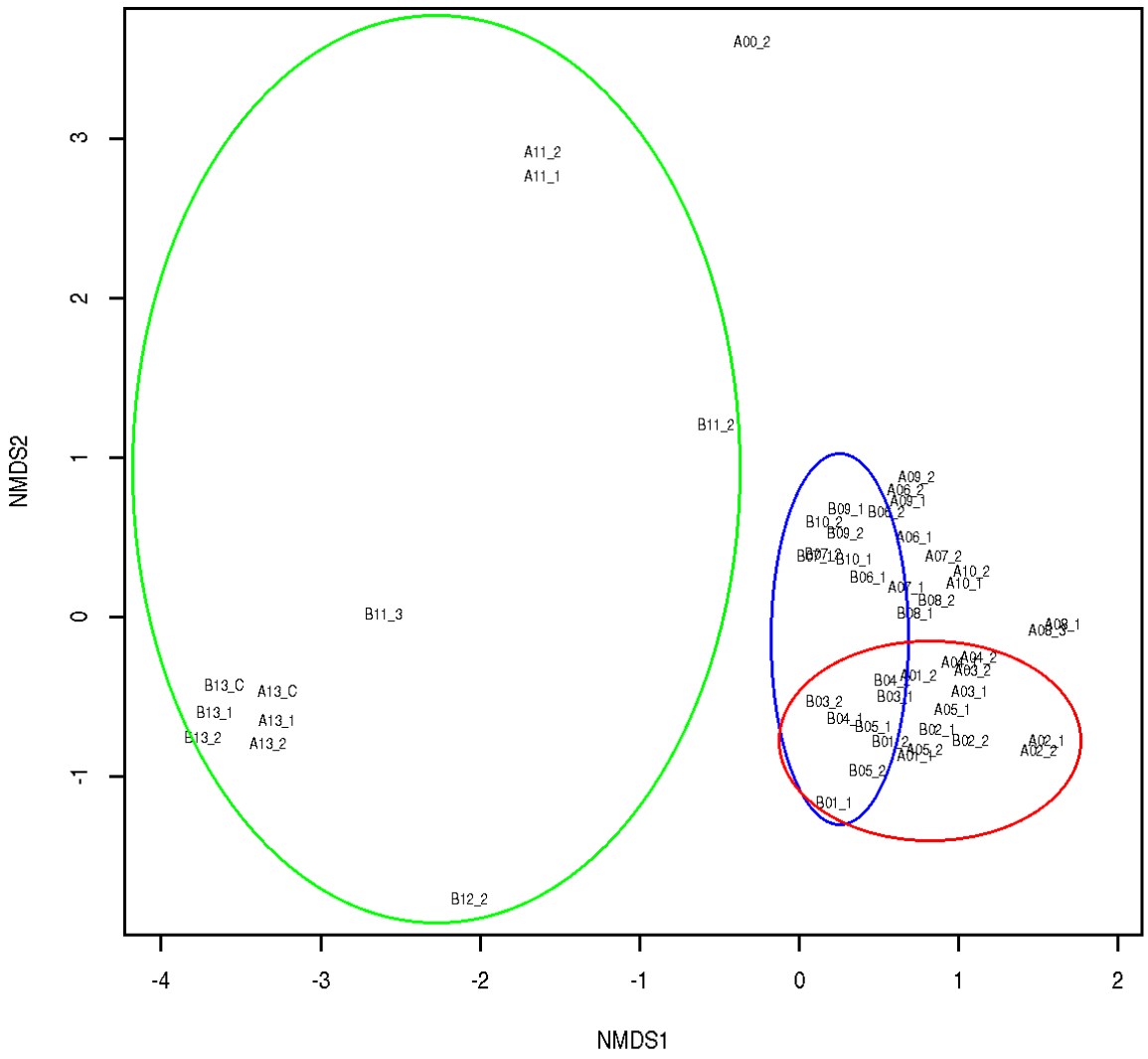
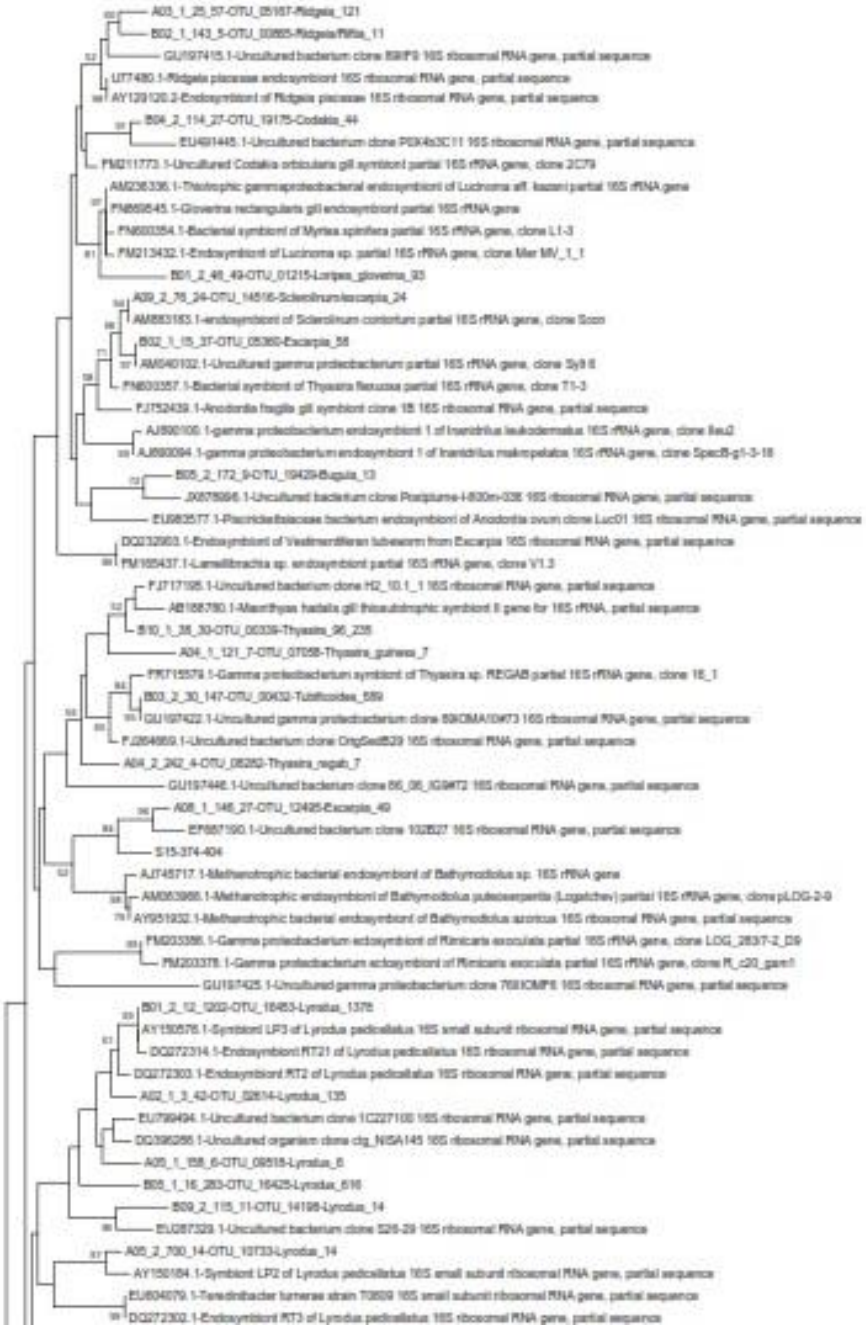
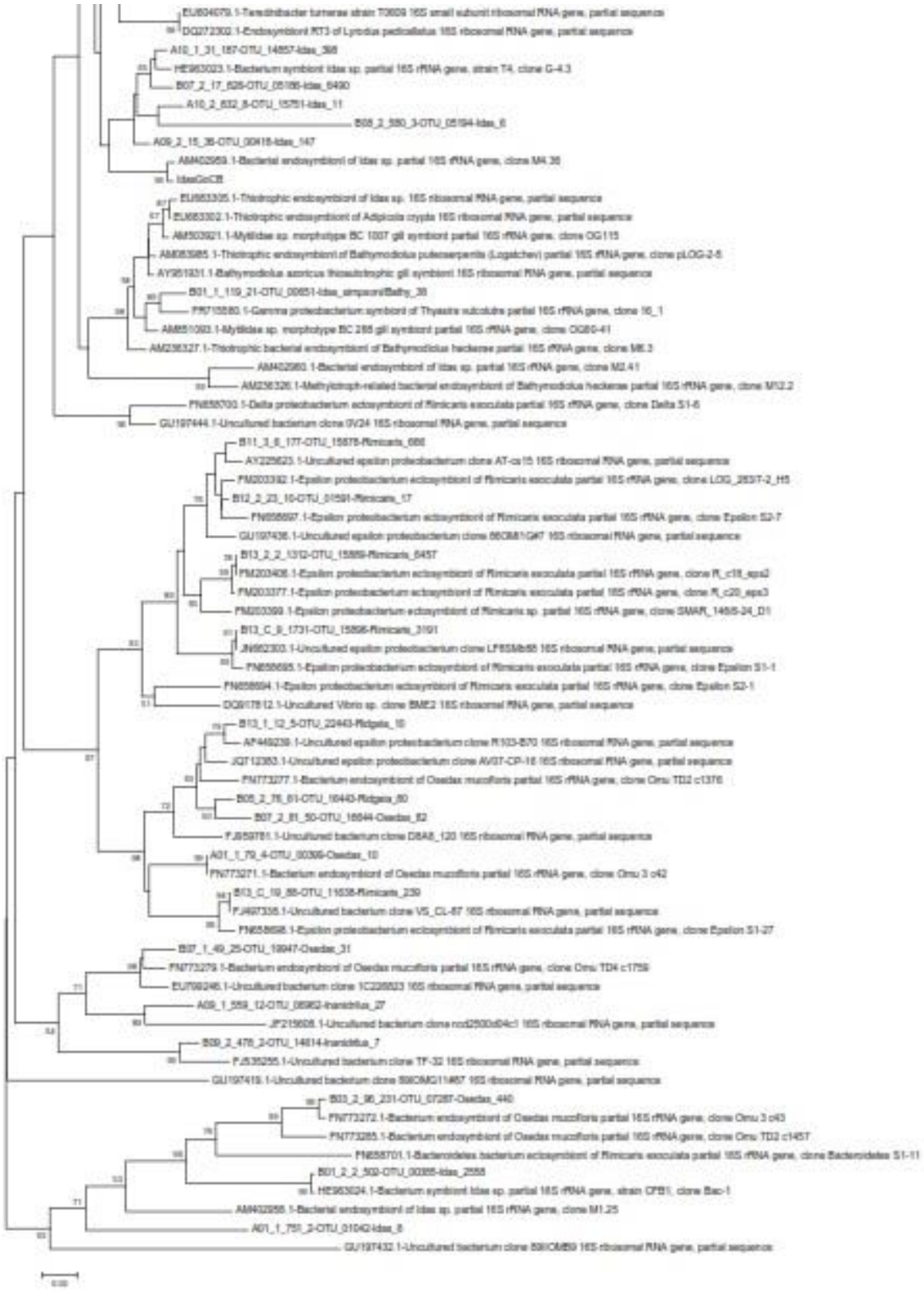


Figure 5-7: Figure S2: NMDS biplot of a Bray–Curtis dissimilarity matrix of the OTU abundance data generated in R (R Development Core Team, 2013) using 'metaMDS()' and 'plot()' functions in MASS package. Sample data has been added using weighted averages. The short-term samples and the negative control are far from the long-term samples (green ellipse), the latter forming two cloud-like groups. Along the horizontal axis (NMDS1), long-term samples are roughly separated by substrate type, with alfalfa on the right and wood on the left (blue ellipse). The vertical axis displays a clear separation between samples from GoC and EM (red ellipse) and samples from MAR and HMMV (upper part), with the alfalfa sample from L-S (A08) in between. Sample IDs are described in Table 1.

Figure 5-8: Figure S3: Phylogenetic tree based on sequences of V5-V6 hypervariable region of 16S rDNA gene obtained from the 'potential symbiont' dataset and on respective sequences of known symbionts in public database. Phylogenetic relationships among sequences were estimated with MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) from a 250-bp ClustalX alignment (Larkin *et al.*, 2007) using distance methods and neighbor-joining. Bootstrap values were computed on 1,000 replicates. Each OTU is represented by sample ID followed by representative OTU number and total number of sequences in the respective OTU. Reference sequences from public database are represented by the accession number followed by the strain name. Based on the tree, OTUs related to environmental sequences were considered as doubtful candidates were not used for further analysis.



Suite de l'arbre à la page suivante


EU834079.1-Teredinibacter turnerae strain T7809 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
DQ272302.1-Endosymbiont RT3 of Lyrodus pedicellatus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
A10_1_31_187-OTU_14857-Idas_366
HE963023.1-Bacterium symbiont Idas sp. partial 16S rRNA gene, strain T4, clone G-4.3
B07_2_17_626-OTU_05186-Idas_6490
A10_2_632_8-OTU_15751-Idas_11
B08_2_580_3-OTU_05194-Idas_6
A09_2_15_36-OTU_00418-Idas_147
AM402569.1-Bacterial endosymbiont of Idas sp. partial 16S rRNA gene, clone M4.36
IdasGinCB
EU883305.1-Thiotrophic endosymbiont of Idas sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EU883302.1-Thiotrophic endosymbiont of Adipicola crypta 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AM503921.1-Mytilidae sp. morphotype BC 1007 gill symbiont partial 16S rRNA gene, clone OG115
AM883985.1-Thiotrophic endosymbiont of Bathymodiolus puteoserpentis (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-2-6
AY961831.1-Bathymodiolus azoricus thioautotrophic gill symbiont 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
B01_1_119_21-OTU_00651-Idas_simpsoniBathy_39
FR715580.1-Gamma proteobacterium symbiont of Thyasira sulcoldes partial 16S rRNA gene, clone 16_1
AM851093.1-Mytilidae sp. morphotype BC 288 gill symbiont partial 16S rRNA gene, clone OG80-41
AM236327.1-Thiotrophic bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M6.3
AM402560.1-Bacterial endosymbiont of Idas sp. partial 16S rRNA gene, clone M2.41
AM236326.1-Methylotroph-related bacterial endosymbiont of Bathymodiolus heckerae partial 16S rRNA gene, clone M12.2
FN656700.1-Delta proteobacterium ectosymbiont of Riftcaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Delta S1-6
GU197444.1-Uncultured bacterium clone 0V24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
B11_3_6_177-OTU_15878-Rimicaris_666
AY225623.1-Uncultured epsilon proteobacterium clone AT-ca15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
FM203392.1-Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone LOG_2S3/T-2_H5
B12_2_23_10-OTU_01591-Rimicaris_17
FN656697.1-Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Epsilon S2-7
GU197436.1-Uncultured epsilon proteobacterium clone 66OM61GM7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
B13_2_2_1312-OTU_15859-Rimicaris_6457
FM203408.1-Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone R_c18_eps2
FM203377.1-Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone R_c20_eps3
FM203399.1-Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris sp. partial 16S rRNA gene, clone SWAR_146/6-24_D1
B13_C_9_1731-OTU_15856-Rimicaris_3191
JN662303.1-Uncultured epsilon proteobacterium clone LF65Mb66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
FN656695.1-Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Epsilon S1-1
FN656694.1-Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Epsilon S2-1
DQ917912.1-Uncultured Vibrio sp. clone BME2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
B13_1_12_5-OTU_22443-Ridgeia_10
AF449239.1-Uncultured epsilon proteobacterium clone R103-B70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
JQ712363.1-Uncultured epsilon proteobacterium clone AV07-CP-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
FN773277.1-Bacterium endosymbiont of Osedax mucofloris partial 16S rRNA gene, clone Omu TD2 c1376
B05_2_76_61-OTU_16440-Ridgeia_80
B07_2_81_50-OTU_16644-Osedax_82
FJ859781.1-Uncultured bacterium clone DBA8_120 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
A01_1_79_4-OTU_00309-Osedax_10
FN773271.1-Bacterium endosymbiont of Osedax mucofloris partial 16S rRNA gene, clone Omu 3 c42
B13_C_19_88-OTU_11638-Rimicaris_239
FJ497355.1-Uncultured bacterium clone VS_CL-87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
FN656696.1-Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Epsilon S1-27
B07_1_49_25-OTU_16947-Osedax_31
FN773279.1-Bacterium endosymbiont of Osedax mucofloris partial 16S rRNA gene, clone Omu TD4 c1759
EU766246.1-Uncultured bacterium clone 1C226523 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
A09_1_559_12-OTU_05962-Ivanoltilus_27
JF215608.1-Uncultured bacterium clone ncd2500d04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
B09_2_478_2-OTU_14614-Ivanoltilus_7
FJ535255.1-Uncultured bacterium clone TF-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GU197419.1-Uncultured bacterium clone 59IOMG11M57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
B03_2_96_231-OTU_07287-Osedax_440
FN773272.1-Bacterium endosymbiont of Osedax mucofloris partial 16S rRNA gene, clone Omu 3 c43
FN773285.1-Bacterium endosymbiont of Osedax mucofloris partial 16S rRNA gene, clone Omu TD2 c1457
FN656701.1-Bacteroidetes bacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Bacteroidetes S1-11
B01_2_2_502-OTU_00395-Idas_2558
HE963024.1-Bacterium symbiont Idas sp. partial 16S rRNA gene, strain CFB1, clone Bac-1
AM402556.1-Bacterial endosymbiont of Idas sp. partial 16S rRNA gene, clone M1.25
A01_1_751_2-OTU_01042-Idas_8
GU197432.1-Uncultured bacterium clone 59IOM59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sample id	Dataset					
	Initial seq number	Dataset_1	Dataset_2	Dataset_3	Potential_symbionts	Confirmed_symbionts
A00_2	8065	6065	5657	4921	0	0
A01_1	9352	5715	4254	3413	257	127
A01_2	9115	6633	5437	4687	167	116
A02_1	11047	8061	7389	5938	70	28
A02_2	12637	6908	4178	3125	30	12
A03_1	12206	7607	6752	6061	153	53
A03_2	12210	6730	5172	4440	37	8
A04_1	10633	5660	4201	3566	195	159
A04_2	11066	6240	4297	3441	157	116
A05_1	10530	6629	5553	4691	121	80
A05_2	10734	6913	5422	4437	125	93
A06_1	10243	6937	6861	6704	582	582
A06_2	11158	8070	7840	7665	438	438
A07_1	10321	5962	5258	4724	525	511
A07_2	13860	7741	7196	6749	745	741
A08_1	9809	5707	4469	3630	27	0
A08_3	8021	5758	4758	4122	15	0
A09_1	9409	5595	4957	4422	480	477
A09_2	11095	6497	5943	5362	236	233
A10_1	10630	6398	5721	5239	332	331
A10_2	10629	6578	5719	5176	348	347
A11_1	7953	4750	4719	4663	0	0
A11_2	15214	10047	10000	9911	0	0
A13_1	8060	5186	4934	4570	941	727
A13_2	8397	4543	4325	4051	906	725
A13_C	8485	4986	4799	4575	763	644
B01_1	9235	7173	7019	6597	536	472
B01_2	10207	8104	7737	7372	1794	1759
B02_1	11323	7756	6748	6108	381	251
B02_2	12925	7794	6811	6144	274	219
B03_1	10913	7802	7241	6831	134	52
B03_2	12376	8512	7819	7247	814	628
B04_1	11500	8126	7739	7425	468	418
B04_2	10686	7966	7698	7377	390	304
B05_1	9800	7237	6928	6445	299	6
B05_2	14667	10574	9981	9401	350	10
B06_1	9848	7018	6923	6791	283	277
B06_2	13032	9975	9907	9772	489	489
B07_1	10310	7392	7290	7035	861	834
B07_2	11384	8315	8061	7655	882	832
B08_1	10697	6648	5796	5262	20	18
B08_2	13131	7762	7020	6214	121	116
B09_1	9939	6143	5946	5678	108	103
B09_2	14533	8247	7806	7138	196	175
B10_1	9704	6276	5988	5729	97	67
B10_2	14753	8218	7730	6951	139	106
B11_2	13851	10106	10043	9832	11	11
B11_3	7929	5387	5033	4741	1427	1215
B12_2	13871	8331	8095	7738	54	54
B13_1	8823	5308	5195	5031	1910	1863
B13_2	9200	5024	4934	4822	1927	1884
B13_C	9409	5523	5322	5097	2681	2590
Total seq nb	564925	364633	332621	306716	24296	21301
Mean seq nb	10864	7012	6397	5898		
Std dev of seq nb	1941	1417	1589	1682		
Nb of OTU at 97 % id		22721	2641	658	39	17
% of seq eliminated		35,45	41,12	45,71	95,70	96,23
Total seq nb in alfalfa	270879	167916	145811	130283	7650	6548
Total seq nb in wood	294046	196717	186810	176433	16646	14753
% of total seq nb alf	47,95	46,05	43,84	42,48	31,49	30,74
% of total seq nb wood	52,05	53,95	56,16	57,52	68,51	69,26

Tableau 5-4: Table S1: Detailed distribution of sequencing data in datasets used in this study. Refer to Table 1 for sample ID.

	Seq nb per sample																											
Sub-division	**A_00**	**A_01**	**B_01**	**A_02**	**B_02**	**A_03**	**B_03**	**A_04**	**B_04**	**A_05**	**B_05**	**A_06**	**B_06**	**A_07**	**B_07**	**A_08**	**B_08**	**A_09**	**B_09**	**A_10**	**B_10**	**A_11**	**B_11**	**B_12**	**A_13**	**B_13**	**Total seq nb**	
Alphaproteobacteria	3138	1111	1196	1468	1525	1430	2270	1022	3564	2477	3984	2132	3733	2189	1794	570	5217	2334	3034	1546	1888	12	121	180	5	0	47940	
Betaproteobacteria	364	264	15	459	36	171	189	55	32	36	1	344	142	182	28	996	94	126	128	626	95	2	29	0	0	0	4414	
Clostridia	2	94	703	0	43	65	780	92	947	15	295	0	0	18	79	0	26	0	53	22	18	0	1	0	8	0	3261	
CFB	323	639	1519	1061	695	501	631	430	700	705	858	3433	998	616	755	936	382	1102	147	1315	100	1	36	7	0	0	17890	
Deferribacteres	0	0	74	157	418	416	588	29	616	16	124	0	0	0	21	1	21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2482	
Deltaproteobacteria	15	3094	4414	879	4014	1876	4635	1247	3879	1633	2175	5491	8320	2182	4142	389	2181	1867	2924	1376	5385	0	85	0	0	0	62203	
Epsilonproteobacteria	0	101	21	0	5	13	140	30	138	63	97	13	107	24	289	2	29	81	235	6	152	470	2546	5	5127	14817	24511	
Gammaproteobacteria	331	2016	3998	3150	5096	5130	3073	3747	3433	2614	6546	2871	3200	5917	6838	4161	2885	4131	5995	5035	4702	14086	11697	7543	7943	131	126269	
Others	744	173	396	1889	267	813	961	315	868	444	1389	68	63	284	496	697	608	143	280	488	172	3	58	3	113	1	11736	
Spirochaetes	4	608	1633	0	153	86	811	40	625	1125	377	17	0	61	248	0	33	0	20	0	168	0	0	0	0	1	6010	
Total seq nb	4921	8100	13969	9063	12252	10501	14078	7007	14802	9128	15846	14369	16563	11473	14690	7752	11476	9784	12816	10415	12680	14574	14573	7738	13196	14950	306716	
	% per sample																											
Sub-division	**A_00**	**A_01**	**B_01**	**A_02**	**B_02**	**A_03**	**B_03**	**A_04**	**B_04**	**A_05**	**B_05**	**A_06**	**B_06**	**A_07**	**B_07**	**A_08**	**B_08**	**A_09**	**B_09**	**A_10**	**B_10**	**A_11**	**B_11**	**B_12**	**A_13**	**B_13**	**Total seq nb**	**%**
Gammaproteobacteria	6,73	24,89	28,62	34,76	41,59	48,85	21,83	53,48	23,19	28,64	41,31	19,98	19,32	51,57	46,55	53,68	25,14	42,22	46,78	48,34	37,08	96,65	80,26	97,48	60,19	0,88	126269	41,17
Deltaproteobacteria	0,30	38,20	31,60	9,70	32,76	17,86	32,92	17,80	26,21	17,89	13,73	38,21	50,23	19,02	28,20	5,02	19,00	19,08	22,82	13,21	42,47	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	62203	20,28
Alphaproteobacteria	63,77	13,72	8,56	16,20	12,45	13,62	16,12	14,59	24,08	27,14	25,14	14,84	22,54	19,08	12,21	7,35	45,46	23,86	23,67	14,84	14,89	0,08	0,83	2,33	0,04	0,00	47940	15,63
Epsilonproteobacteria	0,00	1,25	0,15	0,00	0,04	0,12	0,99	0,43	0,93	0,69	0,61	0,09	0,65	0,21	1,97	0,03	0,25	0,83	1,83	0,06	1,20	3,22	17,47	0,06	38,85	99,11	24511	7,99
CFB	6,56	7,89	10,87	11,71	5,67	4,77	4,48	6,14	4,73	7,72	5,41	23,89	6,03	5,37	5,14	12,07	3,33	11,26	1,15	12,63	0,79	0,01	0,25	0,09	0,00	0,00	17890	5,83
Others	15,12	2,14	2,83	20,84	2,18	7,74	6,83	4,50	5,86	4,86	8,77	0,47	0,38	2,48	3,38	8,99	5,30	1,46	2,18	4,69	1,36	0,02	0,40	0,04	0,86	0,01	11736	3,83
Spirochaetes	0,08	7,51	11,69	0,00	1,25	0,82	5,76	0,57	4,22	12,32	2,38	0,12	0,00	0,53	1,69	0,00	0,29	0,00	0,16	0,00	1,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	6010	1,96
Betaproteobacteria	7,40	3,26	0,11	5,06	0,29	1,63	1,34	0,78	0,22	0,39	0,01	2,39	0,86	1,59	0,19	12,85	0,82	1,29	1,00	6,01	0,75	0,01	0,20	0,00	0,00	0,00	4414	1,44
Clostridia	0,04	1,16	5,03	0,00	0,35	0,62	5,54	1,31	6,40	0,16	1,86	0,00	0,00	0,16	0,54	0,00	0,23	0,00	0,41	0,21	0,14	0,00	0,01	0,00	0,06	0,00	3261	1,06
Deferribacteres	0,00	0,00	0,53	1,73	3,41	3,96	4,18	0,41	4,16	0,18	0,78	0,00	0,00	0,00	0,14	0,01	0,18	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2482	0,81
Total %	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	306716	100
																											% Gam+Del+Alf	76,14
																											% Proteo	85,57

Tableau 5-5: Table S2: The total number of V5-V6 sequences at OTU identity threshold of 97% in each bacterial division or sub-division and relative percentage in total effective bacterial sequences per sample. Refer to Table 1 for sample ID.

	Seq nb per sample																									
OTU	A_00	A_01	B_01	A_02	B_02	A_03	B_03	A_04	B_04	A_05	B_05	A_06	B_06	A_07	B_07	A_08	B_08	A_09	B_09	A_10	B_10	A_11	B_11	B_12	A_13	B_13	Total nb seqs
OTU_00201	2	945	2288	0	2097	225	1976	212	1622	77	465	4052	7389	1196	3016	0	1616	1053	2365	721	3632	0	79	0	0	0	35028
OTU_11277	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	7	7	13	100	0	14	153	181	3	609	11846	6272	0	2	0	19227
OTU_00411	0	782	129	382	381	1781	79	957	59	539	314	38	332	1887	510	2439	1329	0	237	1645	377	0	0	0	0	0	14197
OTU_00023	3	133	21	42	38	174	159	121	232	38	370	1719	2388	839	999	3	992	1340	1841	238	1111	3	8	0	0	0	12812
OTU_05186	0	0	17	0	0	26	41	153	115	0	0	1020	698	1252	1590	0	127	616	277	340	165	0	11	42	0	0	6490
OTU_15889	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	994	0	1992	3471	6457
OTU_00586	0	63	41	136	19	672	68	337	73	21	0	75	0	852	0	292	0	1609	175	775	25	0	4	0	0	0	5237
OTU_01726	0	29	0	0	2498	0	175	64	760	21	236	0	47	0	233	0	173	0	596	0	366	0	0	0	0	0	5198
OTU_00509	0	259	15	459	35	170	187	54	32	0	0	331	136	152	28	923	91	103	128	590	93	0	9	0	0	0	3795
OTU_00574	0	59	56	95	164	207	412	45	273	48	121	61	318	234	246	12	488	106	372	267	185	0	15	0	0	0	3784
OTU_05389	0	0	0	0	3	33	11	0	0	0	0	2727	417	27	0	0	0	152	19	101	0	0	0	0	0	0	3490
OTU_04168	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	3	0	0	0	15	3301	0	0	0	3338
OTU_03075	0	0	726	6	8	0	987	0	138	900	43	0	0	0	0	0	0	0	1	0	518	0	0	0	0	0	3327
OTU_15896	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	221	0	104	2866	3191
OTU_15856	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	137	64	2912	6	3119
OTU_10340	0	0	3	0	0	0	0	0	3	7	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	361	358	2250	37	3022
Total nb seqs	5	2270	3296	1121	5243	3288	4115	1943	3307	1651	1551	10030	11732	6452	6740	3670	4830	5135	6192	4680	7081	11864	11412	464	7260	6380	131712
																							Total nb of seqs in the dataset				306716
short term OTU																							% seqs of the dataset				42,9
	% per sample																									
OTU	A_00	A_01	B_01	A_02	B_02	A_03	B_03	A_04	B_04	A_05	B_05	A_06	B_06	A_07	B_07	A_08	B_08	A_09	B_09	A_10	B_10	A_11	B_11	B_12	A_13	B_13	Total % seqs
OTU_00201	40	41,63	69,42	0,00	40,00	6,84	48,02	10,91	49,05	4,66	29,98	40,40	62,98	18,54	44,75	0,00	33,46	20,51	38,19	15,41	51,29	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00	26,59
OTU_11277	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,06	0,20	1,48	0,00	0,29	2,98	2,92	0,06	8,60	99,85	54,96	0,00	0,03	0,00	14,60
OTU_00411	0	34,45	3,91	34,08	7,27	54,17	1,92	49,25	1,78	32,65	20,25	0,38	2,83	29,25	7,57	66,46	27,52	0,00	3,83	35,15	5,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,78
OTU_00023	60	5,86	0,64	3,75	0,72	5,29	3,86	6,23	7,02	2,30	23,86	17,14	20,35	13,00	14,82	0,08	20,54	26,10	29,73	5,09	15,69	0,03	0,07	0,00	0,00	0,00	9,73
OTU_05186	0	0,00	0,52	0,00	0,00	0,79	1,00	7,87	3,48	0,00	0,00	10,17	5,95	19,40	23,59	0,00	2,63	12,00	4,47	7,26	2,33	0,00	0,10	9,05	0,00	0,00	4,93
OTU_15889	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,71	0,00	27,44	54,40	4,90
OTU_00586	0	2,78	1,24	12,13	0,36	20,44	1,65	17,34	2,21	1,27	0,00	0,75	0,00	13,21	0,00	7,96	0,00	31,33	2,83	16,56	0,35	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	3,98
OTU_01726	0	1,28	0,00	0,00	47,64	0,00	4,25	3,29	22,98	1,27	15,22	0,00	0,40	0,00	3,46	0,00	3,58	0,00	9,63	0,00	5,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,95
OTU_00509	0	11,41	0,46	40,95	0,67	5,17	4,54	2,78	0,97	0,00	0,00	3,30	1,16	2,36	0,42	25,15	1,88	2,01	2,07	12,61	1,31	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	2,88
OTU_00574	0	2,60	1,70	8,47	3,13	6,30	10,01	2,32	8,26	2,91	7,80	0,61	2,71	3,63	3,65	0,33	10,10	2,06	6,01	5,71	2,61	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	2,87
OTU_05389	0	0,00	0,00	0,00	0,06	1,00	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	27,19	3,55	0,42	0,00	0,00	0,00	2,96	0,31	2,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,65
OTU_04168	0	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,13	28,93	0,00	0,00	0,00	2,53
OTU_03075	0	0,00	22,03	0,54	0,15	0,00	23,99	0,00	4,17	54,51	2,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	7,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53
OTU_15896	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,94	0,00	1,43	44,92	2,42
OTU_15856	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20	13,79	40,11	0,09	2,37
OTU_10340	0	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,42	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,16	77,16	30,99	0,58	2,29
Total % seqs	100	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
% of 4 most abundant seqs	100	81,94	73,97	37,82	47,99	66,30	54,29	66,39	57,85	39,61	74,08	57,99	86,23	60,99	68,62	66,54	81,80	49,58	74,68	55,71	80,91	99,87	55,72	0,00	0,03	0,00	61,70

Suite du tableau à la page suivante

Tableau 5-6: Table S3: The total number of V5-V6 sequences at OTU identity threshold of 97% in the most abundant OTUs, represented by more than 1% of the total number of sequences in the dataset (> 3000 amplicons). OTUs were assigned to different bacterial phylotypes by Blast on SILVA 115 database with OTU identity threshold at 97%. The relative percentage was normalized by the total number of the most abundant bacterial sequences per site. Refer to Table 1 for sample ID.

OTU	Total nb seqs	Blast Hit Definition
OTU_00201	35028	KC331356.1.1516;Bacteria;Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales; uncultured bacterium
OTU_11277	19227	JQ799945.1.1350;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Colwelliaceae; Colwellia sp. FS3-4
OTU_00411	14197	GQ348706.1.1402;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Pseudospirillum; uncultured gamma proteobacterium
OTU_00023	12812	FM994679.1.1468;Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;OCS116 clade; uncultured alpha proteobacterium
OTU_05186	6490	HE963023.1.1505;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae; Pseudospirillum bacterium symbiont of Idas sp.
OTU_15889	6457	FM203406.1.1469;Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum; epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata
OTU_00586	5237	EU236402.1.1381;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae; BD1-7 clade; uncultured bacterium
OTU_01726	5198	JF317348.1.1460;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae; Gilvimarinus gamma proteobacterium GE35
OTU_00509	3795	JQ269319.1.1497;Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Methylophilales;Methylophilaceae;Methylotenera; bacterium WH8-7
OTU_00574	3784	AB476277.1.1408;Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Phyllobacteriaceae; uncultured bacterium
OTU_05389	3490	JX854387.1.1280;Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Flammeovirgaceae; Reichenbachiella sp. MAR_2010_115
OTU_04168	3338	JN233568.1.1461;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae; uncultured marine bacterium
OTU_03075	3327	JX391676.1.1506;Bacteria;Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfobacterales;Desulfobulbaceae;Desulforhopalus; uncultured bacterium
OTU_15896	3191	JN662303.1.1373;Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum; uncultured epsilon proteobacterium
OTU_15856	3119	X99762.1.1376;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Vibrionales;Vibrionaceae; Vibrio diabolicus
OTU_10340	3022	X82139.1.1428;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Pseudoalteromonadaceae;Pseudoalteromonas; Pseudoalteromonas tetraodonis
Total nb seqs	131712	
	306716	
short term OTU	42,9	

OTU	Total % seqs	Blast Hit Definition
OTU_00201	26,59	KC331356.1.1516;Bacteria;Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales; uncultured bacterium
OTU_11277	14,60	JQ799945.1.1350;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Colwelliaceae; Colwellia sp. FS3-4
OTU_00411	10,78	GQ348706.1.1402;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Pseudospirillum; uncultured gamma proteobacterium
OTU_00023	9,73	FM994679.1.1468;Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;OCS116 clade; uncultured alpha proteobacterium
OTU_05186	4,93	HE963023.1.1505;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae; Pseudospirillum bacterium symbiont of Idas sp.
OTU_15889	4,90	FM203406.1.1469;Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum; epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata
OTU_00586	3,98	EU236402.1.1381;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae; BD1-7 clade; uncultured bacterium
OTU_01726	3,95	JF317348.1.1460;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae; Gilvimarinus gamma proteobacterium GE35
OTU_00509	2,88	JQ269319.1.1497;Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Methylophilales;Methylophilaceae;Methylotenera; bacterium WH8-7
OTU_00574	2,87	AB476277.1.1408;Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Phyllobacteriaceae; uncultured bacterium
OTU_05389	2,65	JX854387.1.1280;Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Flammeovirgaceae; Reichenbachiella sp. MAR_2010_115
OTU_04168	2,53	JN233568.1.1461;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae; uncultured marine bacterium
OTU_03075	2,53	JX391676.1.1506;Bacteria;Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfobacterales;Desulfobulbaceae;Desulforhopalus; uncultured bacterium
OTU_15896	2,42	JN662303.1.1373;Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum; uncultured epsilon proteobacterium
OTU_15856	2,37	X99762.1.1376;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Vibrionales;Vibrionaceae; Vibrio diabolicus
OTU_10340	2,29	X82139.1.1428;Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Pseudoalteromonadaceae;Pseudoalteromonas; Pseudoalteromonas tetraodonis
Total % seqs	100,00	

Fin de tableau

Anova permutation test								
Variance type	**Terms**	**Degrees of freedom**	**Variance**	**F**	**Nb of permutation**	**Pr**	**Proportion %**	
Constrained	factor(REG)	4	140,58	3,7595	99	0,01	21,4	38,9
	factor(SUBS)	1	30,43	3,2556	99	0,01	4,6	
	DEPT	1	27,48	2,9398	99	0,01	4,2	
	DAYS	1	34,1	3,6473	99	0,01	5,2	
	TEMP	1	23,42	2,5054	99	0,01	3,6	
Unconstrained	Residual	43	401,98				61,1	61,1
Total			658				100	100
Model: rda(formula = spe.hel ~ factor(REG) + factor(SUBS) + DEPT + DAYS + TEMP, data = env, scale = TRUE)								
Permutation test for rda under full model								
Terms added sequentially (first to last)								

Tableau 5-7: Table S4: Estimation of the influence of each variable and factor and their respective significance in redundancy analysis (RDA), assessed using ANOVA permutation tests in R (R Development Core Team, 2013). Sample IDs are described in Table 1.

OTU	Representative sequence	Identity	Gaps	Length	%id	Host estimated by Blast	Host family	Total number of sequences per host family	Total per OTU	A00_2	A01_1	A01_2	A02_1	A02_2	A03_1	A03_2	A04_1	A04_2	A05_1	A05_2	A06_1	A06_2	A07_1	A07_2	A08_1	A08_3	A09_1	A09_2	A10_1	A10_2	A11_1	A11_2	A13_1	A13_2	A13_C
OTU_01215	B01_2_46_49	296	8	310	95	Loripes/Gloverina	Lucinidae	93	93	0	2	2	0	0	0	0	0	0	11	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_00399	A01_1_79_4	286	1	287	100	Osedax	Siboglinidae	505	10	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_07287	B03_2_96_231	296	0	301	98	Osedax			440	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_19947	B07_1_49_25	296	5	311	95	Osedax			31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_14516	A09_2_76_24	308	1	310	99	Sclerolinum/Escarpia			24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_00385	B01_2_2_502	297	1	300	99	Idas	Mytilidae	9646	2558	0	86	73	25	12	25	8	61	60	53	69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_05194	B08_2_580_3	219	1	223	98	Idas			6	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_14857	A10_1_31_187	298	2	305	98	Idas			398	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	187	143	0	0	0	0	0
OTU_05186	B07_2_17_826	298	2	306	97	Idas			6490	0	0	0	0	0	26	0	97	56	0	0	582	438	511	741	0	0	443	173	144	196	0	0	0	0	0
OTU_00418	A09_2_15_36	299	3	309	97	Idas			147	0	31	33	3	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	33	36	0	0	0	0	0	0	0
OTU_15751	A10_2_832_8	295	3	310	95	Idas			11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
OTU_00651	B01_1_119_21	283	5	292	97	Idas/Bathymodiolus			36	0	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_16453	B01_2_12_1202	303	1	305	99	Lyrodus	Teredinidae	1392	1378	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_10733	A05_2_700_14	300	1	308	97	Lyrodus			14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_15896	B13_C_9_1731	304	2	307	99	Rimicaris	Alvinocarididae	9665	3191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	18	48
OTU_15889	B13_2_2_1312	303	2	306	99	Rimicaris			6457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	689	707	596
OTU_01591	B12_2_23_10	297	0	301	99	Rimicaris			17	0	3	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
							Total	21301	21301	0	127	116	28	12	53	8	159	116	80	93	582	438	511	741	0	0	477	233	331	347	0	0	727	725	644

OTU	Representative sequence	Identity	Gaps	Length	%id	Host estimated by Blast	Host family	Total number of sequences per host family	Total per OTU	B01_1	B01_2	B02_1	B02_2	B03_1	B03_2	B04_1	B04_2	B05_1	B05_2	B06_1	B06_2	B07_1	B07_2	B08_1	B08_2	B09_1	B09_2	B10_1	B10_2	B11_2	B11_3	B12_2	B13_1	B13_2	B13_C
OTU_01215	B01_2_46_49	296	8	310	95	Loripes/Gloverina	Lucinidae	93	93	9	49	2	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
OTU_00399	A01_1_79_4	286	1	287	100	Osedax	Siboglinidae	505	10	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_07287	B03_2_96_231	296	0	301	98	Osedax			440	0	0	0	0	5	231	142	6	0	0	0	0	45	0	1	3	0	1	1	4	0	0	0	0	0	0
OTU_19947	B07_1_49_25	296	5	311	95	Osedax			31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_14516	A09_2_76_24	308	1	310	99	Sclerolinum/Escarpia			24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_00385	B01_2_2_502	297	1	300	99	Idas	Mytilidae	9646	2558	407	502	180	130	18	384	208	247	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_05194	B08_2_580_3	219	1	223	98	Idas			6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_14857	A10_1_31_187	298	2	305	98	Idas			398	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_05186	B07_2_17_826	298	2	306	97	Idas			6490	17	0	0	0	28	13	64	51	0	0	277	421	764	826	17	110	103	174	66	99	11	0	42	0	0	0
OTU_00418	A09_2_15_36	299	3	309	97	Idas			147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_15751	A10_2_832_8	295	3	310	95	Idas			11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
OTU_00651	B01_1_119_21	283	5	292	97	Idas/Bathymodiolus			36	21	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_16453	B01_2_12_1202	303	1	305	99	Lyrodus	Teredinidae	1392	1378	18	1202	69	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_10733	A05_2_700_14	300	1	308	97	Lyrodus			14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OTU_15896	B13_C_9_1731	304	2	307	99	Rimicaris	Alvinocarididae	9665	3191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	221	0	563	572	1731
OTU_15889	B13_2_2_1312	303	2	306	99	Rimicaris			6457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	994	0	1300	1312	859
OTU_01591	B12_2_23_10	297	0	301	99	Rimicaris			17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
							Total	21301	21301	472	1759	251	219	52	628	418	304	6	10	277	489	834	832	18	116	103	175	67	106	11	1215	54	1863	1884	2590

Suite du tableau à la page suivante

Tableau 5-8: Table S5: The total number of sequences of symbiont-related OTUs identified by the 'symbio' key word in at least one of their four best BLAST hit definitions and confirmed by the phylogenetic proximity. Only OTUs displaying a symbiont sequence as their closest relative on the phylogenetic tree were retained. Sample IDs are described in Table 1.

OTU	Representative sequence	Identity	Gaps	Length	%id	Host estimated by Blast	Host family	Total number of sequences per host family	Total per OTU	Hit Definition 1	Hit Definition 2
OTU_01215	B01_2_46_49	296	8	310	95	Loripes/Gloverina	Lucinidae	93	93	FN869545.1.1435 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Sedimenticola;Gloverina rectangularis gill endosymbiont	FN600353.1.1504 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Sedimenticola;bacterial symbiont of Myrtea spinifera
OTU_00399	A01_1_79_4	286	1	287	100	Osedax	Siboglinidae	505	10	FN773271.1.1454 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Campylobacteraceae;Campylobacter;bacterium endosymbiont of Osedax mucofloris	JN662186.1.1349 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Campylobacteraceae;Campylobacter;uncultured epsilon proteobacterium
OTU_07287	B03_2_96_231	296	0	301	98	Osedax			440	FN773272.1.1485 Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinilabiaceae;Marinifilum;bacterium endosymbiont of Osedax mucofloris	FR683705.1.1487 Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinilabiaceae;Marinifilum;uncultured marine bacterium
OTU_19947	B07_1_49_25	296	5	311	95	Osedax			31	EU799246.1.1462 Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;SB1-18;uncultured bacterium	HQ216284.1.1243 Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;SB1-18;uncultured bacterium
OTU_14516	A09_2_76_24	308	1	310	99	Sclerolinum/Escarpia			24	AM883183.1.1503 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Sedimenticola;endosymbiont of Sclerolinum contortum	AF165909.1.1461 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Sedimenticola;Escarpia spicata endosymbiont 'Alvin #2837&apo
OTU_00385	B01_2_2_502	297	1	300	99	Idas	Mytilidae	9646	2558	HE963024.1.1490 Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Flammeovirgaceae;Reichenbachiella;bacterium symbiont of Idas sp.	JQ391641.1.1487 Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Flammeovirgaceae;Reichenbachiella;uncultured bacterium
OTU_05194	B08_2_580_3	219	1	223	98	Idas			6	HE963023.1.1505 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Pseudospirillum;bacterium symbiont of Idas sp.	EU050817.1.1417 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;uncultured;uncultured gamma proteobacterium
OTU_14857	A10_1_31_187	298	2	305	98	Idas			398	HE963023.1.1505 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Pseudospirillum;bacterium symbiont of Idas sp.	DQ351750.1.1510 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Pseudospirillum;uncultured gamma proteobacterium
OTU_05186	B07_2_17_826	298	2	306	97	Idas			6490	HE963023.1.1505 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Pseudospirillum;bacterium symbiont of Idas sp.	JN233445.1.1465 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Neptunomonas;uncultured marine bacterium
OTU_00418	A09_2_15_36	299	3	309	97	Idas			147	HE963023.1.1505 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Pseudospirillum;bacterium symbiont of Idas sp.	FR684940.1.1497 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;SAR86 clade;uncultured marine bacterium
OTU_15751	A10_2_832_8	295	3	310	95	Idas			11	HE963023.1.1505 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Pseudospirillum;bacterium symbiont of Idas sp.	EF687362.1.1368 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Alcanivoracaceae;Kangiella;uncultured bacterium
OTU_00651	B01_1_119_21	283	5	292	97	Idas/Bathymodiolus			36	JQ038225.1.1494 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;SUP05 cluster;bacterium G02etB01	GQ346923.1.1380 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;SGPZ551;uncultured gamma proteobacterium
OTU_16453	B01_2_12_1202	303	1	305	99	Lyrodus	Teredinidae	1392	1378	DQ272317.1.1314 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;uncultured;endosymbiont RT6 of Lyrodus pedicellatus	DQ272316.1.1327 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;uncultured;endosymbiont RT12 of Lyrodus pedicellatus
OTU_10733	A05_2_700_14	300	1	308	97	Lyrodus			14	AY150184.1.1404 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;Simiduia;symbiont LP2 of Lyrodus pedicellatus	JF317343.1.1494 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;Simiduia;gamma proteobacterium GE09
OTU_15896	B13_C_9_1731	304	2	307	99	Rimicaris	Alvinocarididae	9665	3191	JN662303.1.1373 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;uncultured epsilon proteobacterium	FJ535300.1.1339 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;uncultured bacterium
OTU_15889	B13_2_2_1312	303	2	306	99	Rimicaris			6457	FM203406.1.1469 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exocula	FM203377.1.1465 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata
OTU_01591	B12_2_23_10	297	0	301	99	Rimicaris			17	FM203393.1.1464 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exocula	FN658697.1.1472 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata

OTU	Representative sequence	Identity	Gaps	Length	%id	Host estimated by Blast	Host family	Total number of sequences per host family	Total per OTU	Hit Definition 3	Hit Definition 4
OTU_01215	B01_2_46_49	296	8	310	95	Loripes/Gloverina	Lucinidae	93	93	FJ752447.1.1503 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Sedimenticola;Loripes lacteus gill symbiont	EU487818.1.1510 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Sedimenticola;uncultured bacterium
OTU_00399	A01_1_79_4	286	1	287	100	Osedax	Siboglinidae	505	10	FJ640817.1.1473 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Campylobacteraceae;Campylobacter;uncultured bacterium	EU555126.1.1482 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Campylobacteraceae;Campylobacter;uncultured bacterium
OTU_07287	B03_2_96_231	296	0	301	98	Osedax			440	EU573101.1.1487 Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinilabiaceae;Marinifilum;bacterium enrichment culture clone EB24.11	GQ261747.1.1470 Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinilabiaceae;Marinifilum;uncultured Bacteroidetes bacterium
OTU_19947	B07_1_49_25	296	5	311	95	Osedax			31	HQ216285.1.1245 Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;SB1-18;uncultured bacterium	FN773275.1.1471 Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;SB1-18;bacterium endosymbiont of Osedax mucofloris
OTU_14516	A09_2_76_24	308	1	310	99	Sclerolinum/Escarpia			24	GU553710.1.1486 Bacteria;Proteobacteria;ARKDMS-49;uncultured bacterium	FM165236.1.1503 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Sedimenticola;uncultured bacterium
OTU_00385	B01_2_2_502	297	1	300	99	Idas	Mytilidae	9646	2558	JQ347322.1.1482 Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Flammeovirgaceae;Reichenbachiella;uncultured bacterium	GU118833.1.1448 Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Flammeovirgaceae;Reichenbachiella;uncultured bacterium
OTU_05194	B08_2_580_3	219	1	223	98	Idas			6	DQ906731.1.1521 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Balneatrix;uncultured marine bacterium	JN016835.1.1494 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;Porticoccus;uncultured bacterium
OTU_14857	A10_1_31_187	298	2	305	98	Idas			398	JQ753170.1.1501 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;BD7-8 marine group;uncultured bacterium	GQ261751.1.1469 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;BD7-8 marine group;uncultured gamma proteobacterium
OTU_05186	B07_2_17_826	298	2	306	97	Idas			6490	JN233327.1.1466 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Neptunomonas;uncultured marine bacterium	JN233175.1.1467 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Oceanospirillaceae;Neptunomonas;uncultured marine bacterium
OTU_00418	A09_2_15_36	299	3	309	97	Idas			147	FJ545516.1.1528 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;Porticoccus;uncultured bacterium	EU817110.1.1393 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;Porticoccus;uncultured bacterium
OTU_15751	A10_2_832_8	295	3	310	95	Idas			11	GU302419.1.1500 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Thiohalophilus;uncultured bacterium	FJ712584.1.1393 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis;Thiohalophilus;uncultured bacterium
OTU_00651	B01_1_119_21	283	5	292	97	Idas/Bathymodiolus			36	AM503923.1.1492 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;SUP05 cluster;Mytilidae sp. morphotype BC 1007 gill symbiont	AB499797.1.1456 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;SUP05 cluster;Bathymodiolus sp. gill symbiont
OTU_16453	B01_2_12_1202	303	1	305	99	Lyrodus	Teredinidae	1392	1378	DQ272313.1.1331 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;uncultured;endosymbiont RT18 of Lyrodus pedicellatus	DQ272305.1.1332 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;uncultured;endosymbiont RT9 of Lyrodus pedicellatus
OTU_10733	A05_2_700_14	300	1	308	97	Lyrodus			14	JF317344.1.1433 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;Simiduia;gamma proteobacterium Y001	FJ153010.1.1487 Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae;Simiduia;uncultured bacterium
OTU_15896	B13_C_9_1731	304	2	307	99	Rimicaris	Alvinocarididae	9665	3191	AY225614.1.1436 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;uncultured epsilon proteobacterium	FN658695.1.1474 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata
OTU_15889	B13_2_2_1312	303	2	306	99	Rimicaris			6457	FM203376.1.1465 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exocula	FN658693.1.1467 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata
OTU_01591	B12_2_23_10	297	0	301	99	Rimicaris			17	FN562844.1.1365 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;uncultured epsilon proteobacterium	FN562840.1.1256 Bacteria;Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae;Sulfurovum;uncultured epsilon proteobacterium

Fin de tableau

6. Article scientifique 2 « Direct evidence for maternal inheritance of bacterial symbionts in small deep-sea clams (Bivalvia: Vesicomyidae) »

Les résultats obtenus dans ce volet de ma thèse ont été publiés dans le journal scientifique « Naturwissenschaften » volume 101, numéro 5 en mai 2014 (Szafranski *et al.*, 2014). La figure supplémentaire S1 est présentée dans l'annexe 1 de ce chapitre. Les travaux supplémentaires (non-publiés) ont été effectués sur *Thyasira* sp. (Bivalves, Thyasiridae) et *Idas* sp. (Bivalves, Mytilidae) selon le même protocole. Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'annexe 2 de cet article. L'une des images acquises au microscope confocal a été choisie par la rédaction de ce journal pour être présentée sur la couverture (Figure 6-1).

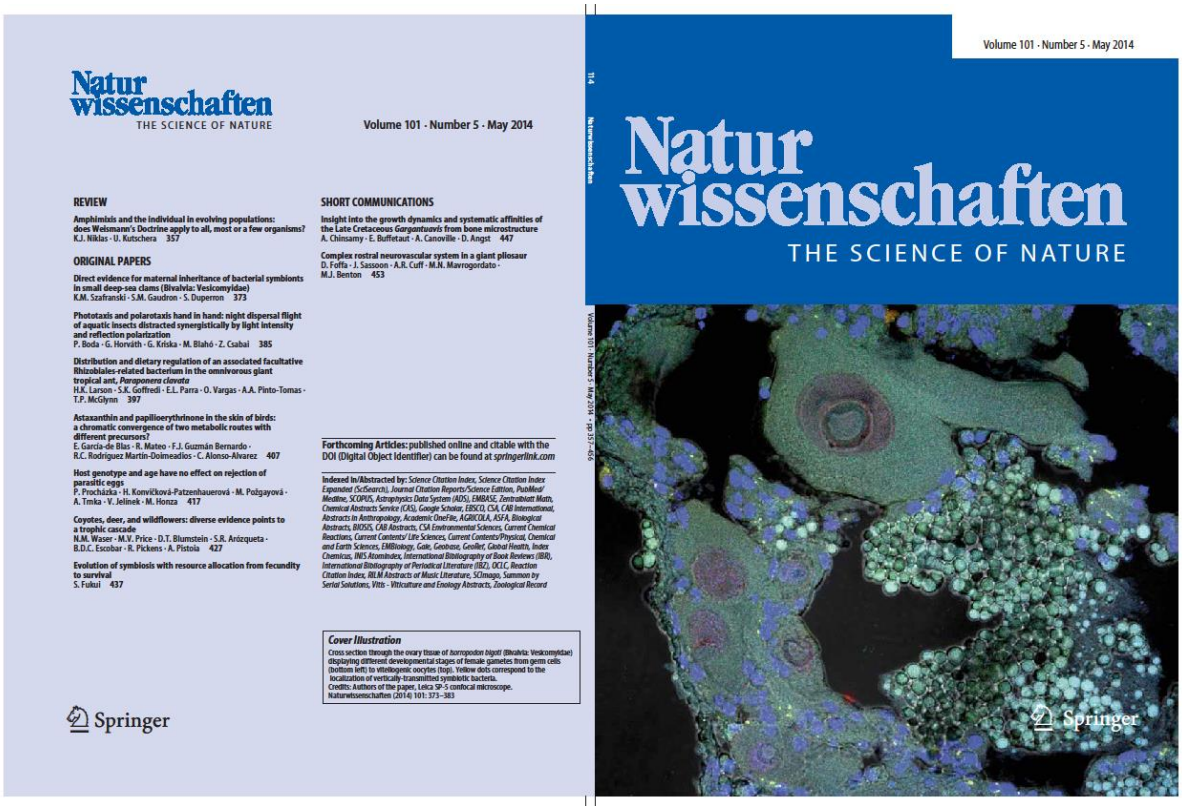


Figure 6-1 : Couverture du journal scientifique « Naturwissenschaften » avec une microphotographie d'une coupe transversale d'un acinus femelle d'*Isorropodon bigoti* (Bivalves, Vesicomyidae) contenant des gamètes à des étapes différents d'ovogenèse, dès les cellules gérminales (en bas à gauche) jusqu'aux ovocytes en vitellogenèse (en haut). Les points jaunes représentent les bactéries symbiotiques transmises verticalement, visualisées à l'aide d'une sonde fluorescente spécifique par la technique de FISH.

Résumé

La transmission des symbiontes bactériens est une étape importante dans le renouvellement de l'association symbiotique à chaque génération de l'hôte. Deux modes de transmission des symbiontes sont distingués : la transmission horizontale où les bactéries sont acquises par l'environnement qui constitue un réservoir de formes libres des symbiontes, et la transmission verticale où les symbiontes sont transmis dans la lignée maternelle dans les gamètes de l'hôte. Les Vesicomyidae sont des bivalves symbiotiques qui colonisent les habitats à base chimiosynthétique et dépendent de leur symbiontes sulfo-oxydants. Deux études antérieures ont suggéré la transmission verticale chez cette famille de bivalves, les deux limitées par les techniques d'acquisition d'image employées à l'époque. Dans cette étude, grâce à l'hybridation *in situ* à fluorescence couplée à la microscopie confocale et à la microscopie électronique à transmission, nous démontrons l'occurrence des bactéries symbiotiques intracellulaires dans les gamètes femelles à toutes les étapes d'ovogenèse, dès les cellules germinales jusqu'aux ovocytes mûrs et dans les stades post-larvaires précoces d'*Isorropodon bigoti*, un petit représentant de la famille des Vesicomyidae colonisant les suintements froids sur le site « Guiness » dans le golfe de Guinée. Les symbiontes sont absents des gonades et des gamètes mâles. Ces travaux confirment la transmission maternelle des symbiontes chez les Vesicomyidae, y compris les petits représentants de cette famille, pour lesquels le mode de transmission n'avait pas encore été documenté.

Naturwissenschaften
DOI 10.1007/s00114-014-1165-3

ORIGINAL PAPER

Direct evidence for maternal inheritance of bacterial symbionts in small deep-sea clams (Bivalvia: Vesicomyidae)

Kamil M. Szafranski · Sylvie M. Gaudron · Sébastien Duperron

Received: 6 January 2014 / Revised: 25 February 2014 / Accepted: 28 February 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Bacterial symbiont transmission is a key step in the renewal of the symbiotic interaction at each host generation, and different modes of transmission can be distinguished. Vesicomyidae are chemosynthetic bivalves from reducing habitats that rely on symbiosis with sulfur-oxidizing bacteria, in which two studies suggesting vertical transmission of symbionts have been published, both limited by the imaging techniques used. Using fluorescence in situ hybridization and transmission electron microscopy, we demonstrate that bacterial symbionts of *Isorropodon bigoti,* a gonochoristic Vesicomyidae from the Guiness cold seep site, occur intracellularly within female gametes at all stages of gametogenesis from germ cells to mature oocytes and in early postlarval stage. Symbionts are completely absent from the male gonad and gametes. This study confirms the transovarial transmission of symbionts in Vesicomyidae and extends it to the smaller species for which no data were previously available.

Keywords Cold seeps · Gametogenesis · *Isorropodon* · Maternal inheritance · Symbiont transmission · Symbiosis · Vesicomyidae

Communicated by: Sven Thatje

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00114-014-1165-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. M. Szafranski · S. M. Gaudron · S. Duperron
UMR7138 Systématique, Adaptation, Evolution (UPMC CNRS IRD MNHN), Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

Present Address:
K. M. Szafranski · S. M. Gaudron · S. Duperron (✉)
UMR7208 Laboratoire Biologie des Organismes Aquatiques et Ecosystèmes (UPMC CNRS MNHM IRD U.CAEN), Université Pierre et Marie Curie, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France
e-mail: sebastien.duperron@snv.jussieu.fr

Introduction

In animal-bacteria symbioses, symbiont transmission is a critical step in the life cycle of both partners. Three different transmission modes are generally distinguished: vertical-maternal, which is the transfer of symbionts to the host progeny via gametes; horizontal-environmental, which involves reinfection of the new host generation from an environmental stock of free-living forms of the symbiont; and horizontal-lateral in which symbionts are acquired from another host. However, many examples of mixed transmission modes can be found, involving vertical and horizontal transfer, or occasional host switching (reviewed in detail by Bright and Bulgheresi 2010). Among chemosynthetic bivalves from reducing marine habitats, the symbiont transmission modes are diverse and family-specific. Environmental acquisition of gill endosymbionts was demonstrated for members of the family Lucinidae based on molecular techniques and electron microscopy (Gros et al. 1996). Subsequently, a free-living form of the *Codakia orbicularis* endosymbiont was shown to be present in the environment (Gros et al. 2003). Morphological and genetic data suggested horizontal transmission of sulfur-oxidizing symbionts in mussels within genus *Bathymodiolus* (DeChaine et al. 2006; Won et al. 2003). Vertical symbiont transmission has been suggested for Solemyidae (Cary 1994; Krueger et al. 1996) but has been best documented in the family Vesicomyidae.

The Vesicomyidae comprise at least 100 species occurring worldwide at cold seeps, hydrothermal vents, or associated with organic remains, at depths ranging from 100 to 9,050 m (Bennett et al. 1994; Goffredi et al. 2003; Krylova and Sahling 2006, 2010). These clams host sulfur-oxidizing Gammaproteobacteria within their gill epithelial cells (Distel et al. 1988; Imhoff et al. 2003; Kim et al. 1995; Newton et al. 2007). Organic compounds are produced by symbionts and provided to the host, while the bivalve hosts supply the

Published online: 13 March 2014

symbionts with oxygen and carbon dioxide from the seawater, as well as with reduced sulfur from the sediment (Cavanaugh 1983).

In Vesicomyidae, two studies on large species suggest vertical symbiont transmission based on transmission electron microscopy (TEM) (Endow and Ohta 1990) or in situ hybridization (ISH) techniques coupled to 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing (Cary and Giovannoni 1993). Endow and Ohta (1990) compared intracellular prokaryotic cells found in gill bacteriocytes with inclusions found in follicle cells and primary oocytes of *Calyptogena soyoae*. Bacteria in all tissues were similar in terms of general morphology and dimensions, presence of electron-lucent vacuoles, and electron-dense granules in the periplasm. Cary and Giovannoni (1993) provided molecular data from three species, namely *C. magnifica*, *C. phaseoliformis*, and *C. pacifica*. They amplified symbiont-specific 16S rRNA genes from the dissected ovarial tissue, which was made possible by the large size of clams. ISH using a specific 16S rRNA-directed probe coupled with digoxigenin confirmed the presence of symbionts in gonad tissues within what they called follicular cells, but not within oocytes. Further indirect supports for vertical symbiont transmission in Vesicomyidae are the congruent host and symbiont molecular phylogenies, which suggest cospeciation and a long-term association between the participants in this symbiosis (Peek et al. 1998). Moreover, genomic data indicate reduced genome size, gene loss, and complementation with host genes (Kuwahara et al. 2007; Newton et al. 2007, 2008), as observed in maternally inherited insect-associated bacteria which are unable to live outside their hosts (i.e. *Buchnera aphidicola*) (Gómez-Valero et al. 2007).

The hypothesis of strict vertical transmission for the Vesicomyidae was challenged by studies suggesting a mixed mode of symbiont transmission consisting of predominantly vertical transmission punctuated with instances of lateral symbiont acquisition in *Vesicomya* sp. from the Mid-Atlantic Ridge (Stewart et al. 2008, 2009). Recently, it was suggested that physical proximity may promote such events of acquisition of nonparental symbiont strains in two phylogenetically distant but sympatric vesicomyid species: *Christineconcha regab* and *Laubiericoncha chuni* (Decker et al. 2013).

Although the hypothesis that symbiont acquisition occurs mainly via maternal inheritance in Vesicomyidae is supported and despite a few recent results indicating occasional lateral acquisition of nonparental symbionts, the exact mechanism remains unclear, and whether smaller species (<1 cm) display similar maternal inheritance as observed in the much larger species is not yet known. Here, we investigate the reproduction features and the details of symbiont transmission in *Isorropodon bigoti*, a vesicomyid from cold seeps in the Gulf of Guinea harboring sulfur-oxidizing bacteria (Rodrigues et al. 2012). The occurrence of symbionts is tested in gonads and gametes at all stages of gametogenesis, as well as in early postlarvae, (i.e., individuals collected after larval settlement and metamorphosis) using fluorescence in situ hybridization (FISH) with group-specific probes, while their intra- or extracellular localization is ascertained using TEM.

Material and methods

Sampling, collection, and fixation

Isorropodon bigoti (Bivalvia, Vesicomyidae) (von Cosel et al. 2001) were collected in February 2011 from a pockmark at the Guiness cold seep site during the WACS cruise aboard RV *Pourquoi Pas?* (ROV *Victor 6000*, dive 433, 1°34.65′S, 8°32.91′E, 582-m depth). The clams (2–6 mm) were collected from the first upper centimeters of the sediment using a blade corer. The Guiness' site (Gulf of Guinea), comprises several pockmarks, most of them inactive. Active seepages are colonized by fauna typical of both bathyal and continental margin zones. Seep specialists include bivalves *Elenaconcha guiness* and *Calyptogena valdiviae* (Vesicomyidae), *Acharax* sp. (Solemyidae) and *Thyasira* sp. (Thyasiridae); tubeworms *Lamellibrachia* sp. are also reported (Siboglinidae) (Duperron et al. 2012).

Ten specimens of *I. bigoti* were fixed on board for fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments and histological serial sectioning, using 4 % formaldehyde in twice-filtered seawater (TFSW) (4 °C, 2–4 h), rinsed twice in TFSW and then transferred in a gradient of ethanol (50, 80, and 100 %). Three specimens were fixed in buffered 2.5 % glutaraldehyde (pH 7.4) for 24 h and then rinsed in TFSW for TEM. All samples were stored at 4 °C and dissected in the laboratory under a dissecting microscope.

Hematoxylin and eosin staining

Fixed *I. bigoti* specimens were rinsed in butan-1-ol (100 %) and in Histo-Clear (EMS, USA) before being embedded in Paraffin Embedding Wax (melting point 52 °C; Peel-A-Way, EMS, USA). The soft tissues (animals without shell) were cut into 8-µm-thick sections using a microtome (Jung, Heidelberg, Germany) and deposited on SuperFrost Plus slides (EMS, USA). Standard hematoxylin and eosin staining protocol was used on one in every ten slides and coverslip was mounted with Permount (EMS, USA). Histological and anatomical observations were performed on an Olympus BX61 light microscope (Olympus, Japan). Basophilic cell structures appeared purple and acidophilic appeared pink. Gamete measurements (circular diameter), as well as shell measurements (length and height), were made with ImagePro software. The circular diameter of gametes (d) was calculated as follow: $d=(a\times b)^{0.5}$, where (a) and (b) are the lengths of the major and minor elliptical axes, as oocytes may become ellipsoidal during

their growth (Beninger and LePennec 1997; Heyl et al. 2007; Scheltema and Williams 2009; Tyler et al. 2009). In addition, oocyte measurements were restricted to those oocytes in which the nucleus was clearly visible.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

FISH and CARD-FISH (CAtalysed Reporter Deposition-FISH) were employed to reveal the presence of bacteria in gonads, gametes, and early post-larval stages. The small size of *I. bigoti* allowed internal negative and positive controls (muscle and gill, respectively) in the same histological section on most of the slides. The paraffin wax was removed using Histo-Clear, tissues were rehydrated in decreasing ethanol series (96→70 %) prior to FISH using Cy3- and Cy5-labeled probes, performed as described previously (Duperron et al. 2005) with a hybridization buffer containing 40 % formamide. The probes used in this study were IMedT2-193, targeting the 16S rRNA (small subunit), originally designed for mussel symbionts, used here as mussel symbionts are closely related with vesicomyid symbionts (5′-TAGAGG CCTCCTTTA-3′; Duperron et al. 2008; Rodrigues et al. 2012); EUB-338, targeting most Eubacteria (5′-GCTGCCTC CCGTAGGAGT-3′; Amann et al. 1990) and NON-338, as a control for nonspecific binding (5′-ACTCCTACGGGAGG CAGC-3′; Wallner et al. 1993). Additional negative controls were performed using all probe combinations on slides treated with RNase A (2 mg mL^{-1}; 15 min).

CARD-FISH experiments using horseradish peroxidase (HRP)-labeled probes (EUB338 and IMedT2-193) were performed as described by Schönhuber et al. (1997) with slight modifications: (1) internal peroxidases were inactivated on slides for 20 min in H_2O_2 (0.5 % in PBS buffer) after the lysozyme permeabilization step; (2) slides were stabilized in PBS buffer prior to CARD reaction, which was completed according to manufacturer's instructions (TSA Cyanine 5 System, PerkinElmer, USA). After 30 min at 37 °C, the slides were rinsed in the same buffer for 15 min, dipped in H_2O, and air dried. SlowFade® Gold with DAPI (Molecular Probes) was applied directly on slides to prevent bleaching of fluorescent dyes. Image acquisition was performed using a Leica SP5 confocal microscope (Leica, Germany).

Transmission electron microscopy (TEM)

Glutaraldehyde-fixed samples were rinsed in TFSW, dissected (gill, visceral mass, and foot separated) and postfixed in 1 % osmium tetraoxide (45 min, RT). After the dehydration step in increasing ethanol series and 1,2-propylene oxide, tissues were embedded in medium Epon resin (Agar 100 Resin, Great Britain). Sections were cut on a Leica Ultracut R ultramicrotome. Semithin sections were stained with toluidine blue, and ultrathin sections (75-nm thick) were contrasted with uranyl acetate (5 %) and examined under a Zeiss EM912 Omega transmission electron microscope operated at 80 kV.

Post-larvae

In parallel, FISH experiments with the same probes were performed on five FISH fixed *Isorropodon* post-larvae (length ~200 μm with shells) collected from colonization devices (CHEMECOLIs) carried on in 2007 for 1 year in Eastern Mediterranean (Gaudron et al. 2010). FISH tissues were embedded in LR White resin. In order to confirm that larvae actually belong to the genus *Isorropodon*, the gene encoding mitochondrial 16S rRNA was sequenced as follows. DNA extraction of ethanol fixed tissue of one post-larva was done using a QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN). Molecular identification was possible by PCR, ~500 bp part of the mitochondrial 16S rRNA gene was amplified using the primer pair 16SarL (5′-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3′) and 16SbrH (5′-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3′) (Palumbi et al. 2002), then gel excised, cloned, and sequenced.

Results

Morphology and anatomy

The shell length of specimen ranged between 2 and 6 mm. The visceral mass was surrounded by gill tissue organized in filaments consisting of two layers of epithelial cells (bacteriocytes) occurring in the lateral zone of gill filaments. The digestive tract was located in the dorsal part of the visceral mass and seemed to form a short, single tube. Gonads were found dorsal to the foot and ventral to the digestive tract and occupied about 25 % of the visceral mass. Both male and female gonads were organized in a similar way and consisted of round-shaped canals (acini). Gametes at different developmental stages could be observed inside acini. All gamete dimensions and main characteristics are summarized in Table 1. Out of thirteen specimens, we identified nine females and two males of similar size range. For two specimens, the sex could not be determined because of lack of gonad tissues on slides. No hermaphrodite was identified.

Oogenesis

The female gonad consisted of a cluster of 15 to 40 acini surrounded by a thin acinal wall. Each acinus is composed of germ cells forming the wall epithelium, oogonia, previtellogenic oocytes initially attached to the inner wall of the acinus, vitellogenic primary oocytes, and mature oocytes which stay in close contact to germline epithelium wall (Fig. 1a). Germ cells were basophilic and constituted a thin epithelium forming the acinus (mean diameter±SD=142.7±45.7 μm; n=31; four

Table 1 Details on female and male gametes size and main histological features

Sex	Cell type	Gametes size [μm]			Main features		
		Mean diameter	Standard deviation	No. of measurements	H&E staining	Shape	Figure
Female	Germ cells	6.4	1.6	23	Basophilic	Cuboid	1a; 1d; 2c
	Oogonia	30.4	8.8	17	Basophilic cytoplasm, acidophilic nucleus	Round	1a; 2e
	Pre-vitellogenic oocytes					Ellipsoidal	1a; 1e
	Vitellogenic oocytes	55.7	8.8	29	Basophilic cytoplasm, acidophilic nucleus	Ellipsoidal	1a; 2g; S1a
	Mature oocytes	97.4	22.6	27	Acidophilic	Round	1a; 1f–g; 2h; S1b–c
Male	Germ cells	3.8	0.4	17	Basophilic	Cuboid	1b; 3a–b
	Spermatogonia	3.9	1.3	44	Basophilic	Round	
	Spermatocytes	1.2	0.2	27	Basophilic	Round	
	Spermatids	1.6	0.5	34	Basophilic	Round	
	Mature spermatozoids	2.3	0.8	69	Acidophilic	Elongated	

specimens analyzed; Table 1). On the transmission electron micrograph (Fig. 2c), germ cells were cuboidal with a promi-nent nucleus, scant cytoplasm filled with rough endoplasmic reticulum (RER) and few mitochondria. Round oogonia (Ov), ellipsoidal pre-vitellogenic (pVO), and vitellogenic oocytes (VO) (Fig. 1a; Table 1) were anchored to the acinus wall and showed a developed nucleus, as well as a visible nucleolus and scant cytoplasm. Numerous arrays of RER, swollen cisternae in the cytoplasm, electron-dense granules formation, and the nucleus containing scattered clumps of heterochromatin were observed in oogonia (Fig. 2e). In pre-vitellogenic oocytes, numerous mitochondria (Fig. 2g) and visible nucleolus with scattered chromatin within the nucleus were observed. Vitellogenic oocytes (VO) were still in contact with the germline epithelium wall. The VO at the Prophase I of the meiosis appeared pedunculated with developed nuclei forming the germinal vesicle (mean nucleus diameter±SD=27.4±6.7 μm; n=29; Table 1) and filled with an increasing volume of cytoplasm (Fig. 1a). The germinal vesicle and a prominent nucleus occupied most of the cell. The numerous electron-lucent vesicles (vitelline) and some electron-dense lipid and yolk granules could be observed on sections (Fig. S1A). In mature oocytes, the cytoplasm reached the size of the acinus and was still in contact with few germ cells. Mature oocytes were filled with different types of organelles, mainly by lipid droplets (Table 1). Several electron-dense structures could be observed (Fig. S1A-C): germ plasm, which are cloud-like granules (Balbiani bodies) in ooplasm; lipid droplets; Yolk granules; mitochondria in lysis; and other electron-lucent vesicles. The microvilli projections were observed in the outer membrane of the mature oocyte (Fig. S1B). During oogenesis, mitochondria were numerous; in later stages, some of them were in lysis or exocytosis, RER was disappearing (Fig. S1D-F).

Spermatogenesis

Testes were also organized in acini in which the germinal epithelium was surrounded by loose connective tissue. Germ cells were located within the inner wall of the round-shaped acinus. The acini were lined with spermatogonia and towards the lumen the following cell types were progressively encountered: spermatocytes, spermatids, and spermatozoa (Fig 1b; Table 1). Because the two males were not fixed in glutaraldehyde, no ultrastructure was available; therefore, the flagellum of the spermatozoa could not be seen.

FISH

Positive and unambiguous signals were obtained from the gills of all specimens and on each section when using the Eubacteria probe EUB338 and symbiont-specific probe ImedT2-193. CARD-FISH signals were stronger than those in classical FISH (data not shown), but because a single probe could be applied at once, most experiments were done using the basic FISH protocol. Signal patterns were identical for both. Bacteria were abundant in the lateral zone of gill filaments and occupied most of the volume within a single bacteriocyte (Fig. 1c). Groups of bacteria or single bacteria were successfully localized in the female gonad. Bacterial symbionts were present in germ cells (Fig. 1d). Moreover, signals could be detected in the periphery of pre-vitellogenic (Fig. 1e) and mature oocytes (Fig. 1 f–g), most often with uncertain localization within or outside oocytes, although Fig. 1g suggests intracellularity.

Male gonads yielded positive signals using all probes, including NON-338, localized in the lumen of acini, in between the spermatozoa. The male acini on RNase-treated slides still showed the same FISH signal pattern, while there was no signal in bacteriocytes (Fig. 3a–b). Regardless of sex,

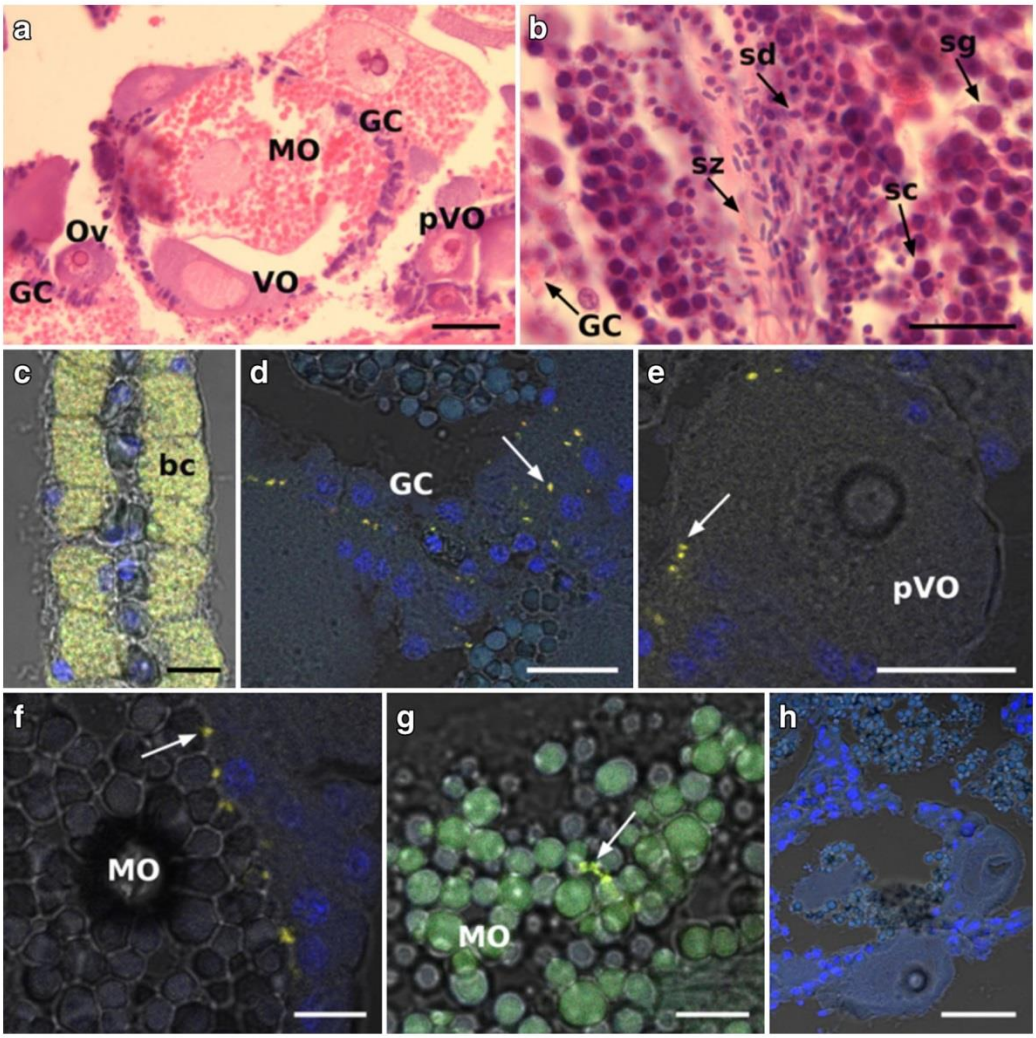


Fig. 1 **a**–**b**: Hematoxylin and eosin staining of *Isorropodon bigoti* gonad tissues. **a** Cross-section through the female acinus with all stages of gamete differentiation: *GC* germ cells, *Ov* oogonia, *pVO* pre-vitellogenic oocytes, *VO* vitellogenic oocytes, and *MO* mature oocytes. *Scale bar*= 50 μm. **b** Cross-section through the male acinus with all stages of gamete differentiation: *GC* germ cells, *sg* spermatogonia, *sc* spermatocytes, *sd* spermatids and *sz* spermatozoa. **c**–**h**: Fluorescence in situ hybridization on cross-sections of *I. bigoti* tissues. Signals from probes EUB-338 (Cy-3, in *green*) and IMedT2-193 (Cy-5, in *red*) fully overlap, yielding a yellow color. All slides were counterstained with DAPI (host nuclei visible in *blue*). *Scale bars*=10 μm (**c**, **f**, **g**) 20 μm (**d**, **e**) and 50 μm (**h**). **c** Gill filament with visible bacteriocytes (*bc*). **d** Germ cells (*GC*) with symbiotic bacteria (*white arrow*). **e** Pre-vitellogenic oocyte (*pVO*) with symbionts (*white arrow*). **f** Mature oocyte (*MO*) with symbiotic bacteria (*white arrow*) close to the cell membrane. ***g*** Another view of the mature oocyte (*MO*) with symbionts (*white arrow*) inside the cell between vitellus. **h** Cross-section through the ovary tissue, on slides treated with RNase A, no FISH signal could be detected

no positive signal was observed in muscle tissue using any probe with both FISH and CARD-FISH, and no signal was detected in any tissue when using the NON-338 probe, and on RNase-treated slides using any of the probes (Fig. 1h).

FISH experiments with IMedT2-193, EUB-338 and NON-338 probes showed a typical signal patterns in developing gill epithelium of *Isorropodon* early post-larvae (Fig. 3c). The amplified mitochondrial 16S rRNA gene fragment was 100 % identical to the control sequence from adult *Isorropodon* specimen (accession numbers: KJ499840-1).

TEM on bacterial symbionts

All three specimens fixed for TEM were females. Thiotrophic symbionts observed in gill epithelium served as a reference for comparison with candidate bacteria found in gonads. Bacteriocytes in the gill tissue were filled with vacuoles

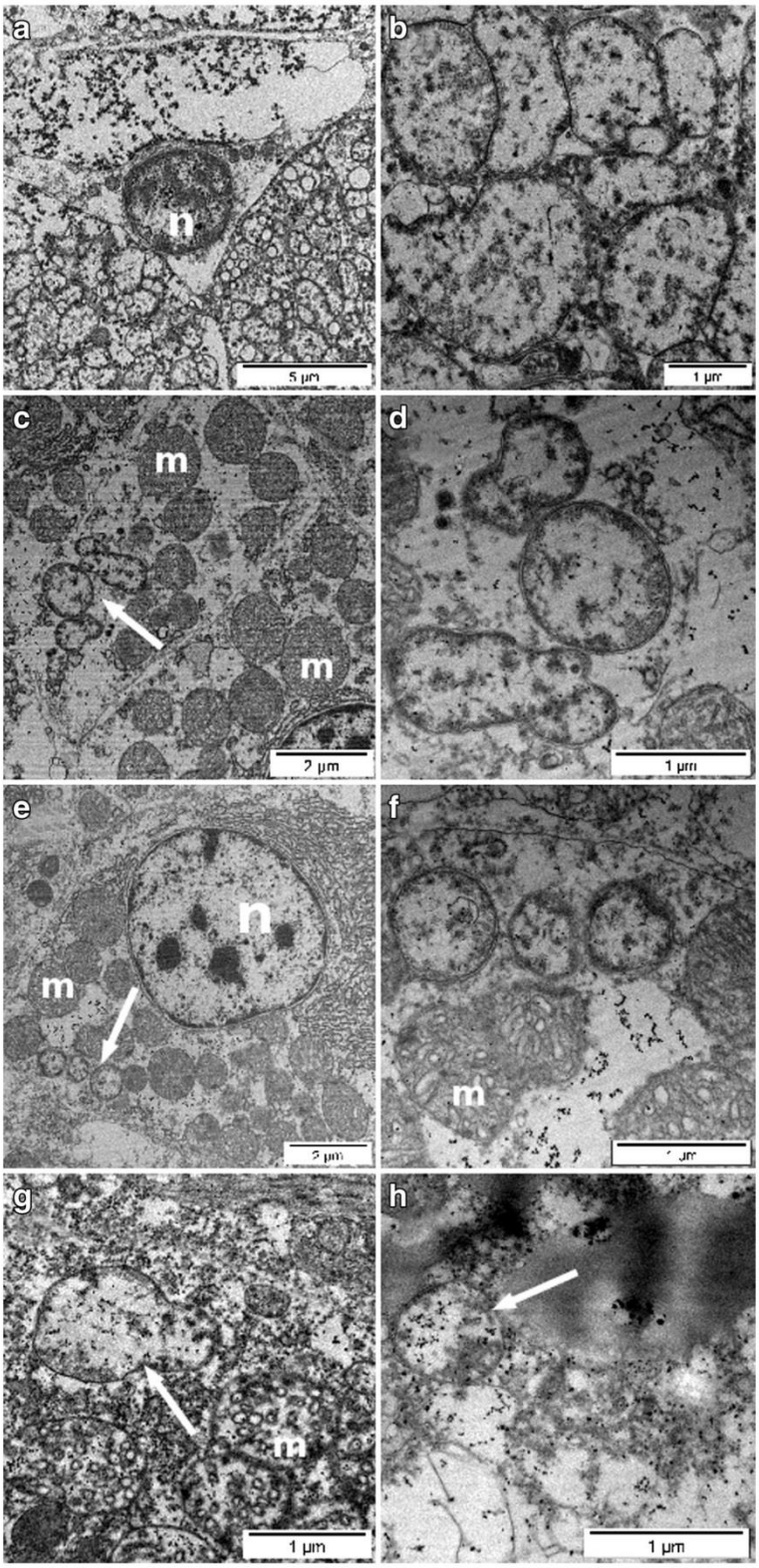


Fig. 2 Transmission electron micrographs of *Isorropodon bigoti* tissues with endosymbiotic bacteria. **a** Cross-section through the basal part of gill bacteriocyte showing a general organization of the cell (*n* nucleus) and distibution of endosymbionts. **b** Ultrastructure of symbiotic bacteria inside the gill bacteriocyte. **c** A general view of germ cell with endosymbionts (*white arrow*). **d** Three bacterial cells inside one germ cell. **e** A general view of oogonium with endosymbionts (*white arrow*). **f** Three symbiotic bacteria close to the cell membrane of oogonium. **g** Symbiotic bacterium (*white arrow*) among mitochondria (*m*) inside the vitellogenic oocyte. **h** Endosymbiotic bacterium (*white arrow*) inside the mature oocyte

enclosing between 4 and 8 oval or coccoid electron-lucent bacteria with a typical Gram-negative double membrane (Fig. 2a–b). Some bacteria displayed another electron-lucent vesicle in their periplasm (Fig. 2b). Sizes ranged from 1 to 2 μm in diameter and from 2 to 3 μm in length (mean diameter±SD=1.43±0.3 μm; n=40). The shape was often irregular. Putative prokaryotic cells displaying morphological characteristics similar to those observed in gills were observed in the cytoplasm of female gametes of different stages in all three clams. Single bacterial cells were enclosed in a vacuole. Groups up to four intracellular bacteria were observed on a single section in germ cells (Fig. 2c–d), oogonia (Fig. 2e–f), pre-vitellogenic oocytes, vitellogenic (Fig. 2g), and mature oocytes (Fig. 2h). Inside oocytes, most of the bacteria were seen close to the periphery as seen on FISH images, yet intracellular. Bacteria found in female gonads were smaller than those in gill bacteriocytes (mean diameter ±SD=1.05±0.29 μm; n=20) and had more regular round shapes.

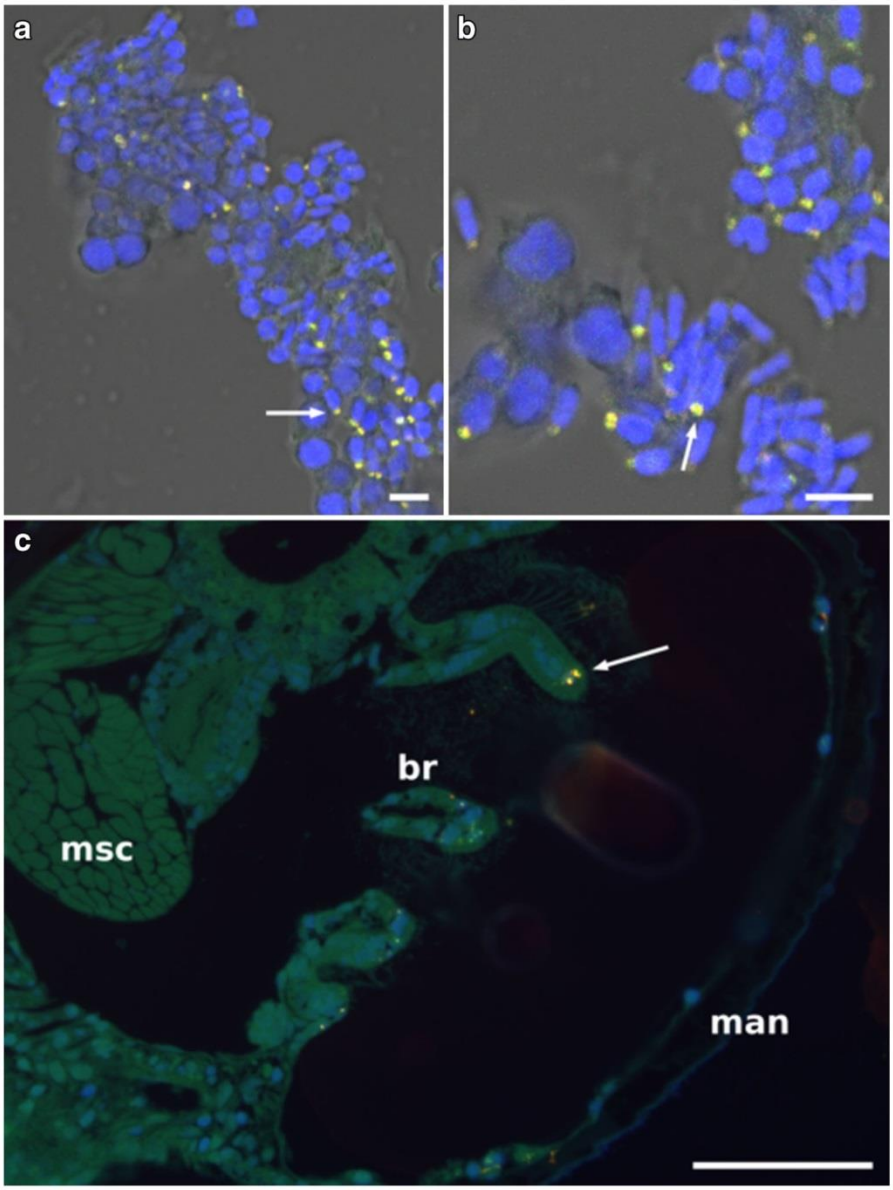


Fig. 3 **a–b** Fluorescence in situ hybridization on cross-sections of *I. bigoti* male acini on RNase A treated slides. False positive signals from probes EUB-338 (Cy-3, in *green*) and IMedT2-193 (Cy-5, in *red*) fully overlap, yielding a yellow color (*white arrows*). Slides were counterstained with DAPI (DNA visible in *blue*). *Scale bars*= 5 μm. **c** The general larvae organization on fluorescence in situ hybridization cross-sections: muscle tissue (*msc*), mantle (*man*), and gill tissue (*br*). FISH experiments with IMedT2-193, EUB-338 and NON-338 probes showed a typical signal pattern in gill epithelium (*white arrow*) of *Isorropodon* larvae. *Scale bar*= 50 μm

Discussion

To date, information available supporting vertical transmission of symbionts in deep-sea clams was based on transmission electron microscopy (Endow and Ohta 1990) or in situ hybridization (ISH) techniques coupled to 16S rRNA sequencing (Cary and Giovannoni 1993). FISH and CARD-FISH techniques (Amann et al. 1991; Schönhuber et al. 1997) are more sensitive than ISH, yielding bright and localized fluorescent signals. PCR-based detection of symbionts in gonad tissue (Cary and Giovannoni 1993; Krueger et al. 1996) is also a sensitive technique, yet restricted to relatively large animals, where the entire gonad can be isolated without contamination by gill bacteria. Here, we investigated symbiont transmission in a small clam in which the physical separation of gonad tissue was not possible. Yet, save for its small size, the general anatomy of *I. bigoti* was similar to that of larger Vesicomyidae (von Cosel et al. 2001).

Reproduction

I. bigoti is a gonochoristic species displaying male and female acini in separate specimens. No evidence for hermaphroditism was found, although simultaneous or successive hermaphrodites were reported in *Calyptogena phaseoliformis* and *C. magnifica* (Le Pennec and Beninger 2000). For 2 out of 13 specimens analyzed, the sex was not possible to determine. Presence of gametes at different stages suggests a continuous spawning ability. In *C. kilmeri*, reproduction was suggested to be seasonal, while in *C. pacifica*, oocytes were ready for spawning all over the year (Lisin et al. 1997). Specimens used in our study were collected during a single cruise; therefore, seasonality could not be explored more in details. The sex ratio was skewed towards females. Mature oocytes displayed a size similar to that of larger vesicomyid clams (Table 1).

Testes from two male *I. bigoti* showed a typical morphology of bivalve gonad (Beninger and Le Pennec 1997) (Fig. 1b). Again, the cooccurrence of all stages with mature spermatozoa suggests a continuous rather than seasonal reproduction.

Symbionts in adult host tissues

The general gill organization and bacterial FISH signals were similar to those of other vesicomyid clams (Rodrigues et al. 2012; Duperron et al. 2012). Individual bacteria, positive with the symbiont probe, were also localized in the female gonad. By using FISH, we confirmed the actual occurrence of symbionts in gonad tissue in Vesicomyidae (Cary and Giovannoni 1993). We observed the intracellular occurrence of these bacteria within oocytes at different stages, but the more advanced the developmental stage of a gamete, the fewer bacteria could be observed within a single gamete. Our results support that bacterial symbionts are present at all steps of female gametogenesis from germ cells to mature oocytes, providing a way for vertical transfer through female gametes (transovarial inheritance). Oocytes derive initially from germ cells, within which bacteria are present, though smaller and less abundant than in gill bacteriocytes. Bacteria seem to remain intracellular during all gametogenesis. This suggests a strictly intracellular route of inheritance from mother to offspring, rather than contamination of developing gametes by environmental bacteria which would have entered the acinus. Bacteria were detected in about 1 out of 10 mature oocytes. On a given FISH slide, only one or a few bacteria were seen, and TEM confirmed the occurrence of single bacterial cells within vacuoles in both germ cells and oocytes, with very few dividing stages. FISH signals in mature oocytes were scarce because of low total number of bacteria dispersed in a more and more voluminous three-dimensional structure. The volume of oocytes is indeed much higher than that of germ cells, and symbionts do not seem to divide actively within developing gametes; the chance of seeing a FISH signal in oocytes is thus lower, as their diameter is at least 10 times the thickness of slides. The TEM observation of single bacterial cells within vacuoles in both germ cells and oocytes further supports this hypothesis, and very few dividing stages were seen. This lack of dividing stages may suggest the temporary inhibition of bacterial cell divisions during oogenesis.

In male acini, all IMedT2 signals cohybridized with those of NON probe, even on RNase-treated slides. This indicates nonspecific binding of fluorescent dyes or probes and that the signal is an artifact. No observed signal could be considered as a putative symbiont (Fig. 3a–b). The symbiotic bacteria were absent in all other organs and tissues of *I. bigoti* regardless of sex.

Symbiont translocation and possible consequences on symbiont transmission

Contrary to insect bacteriomes, specialized organs housing endosymbiotic bacteria which are close to gonads, the symbiont-harboring organs in Vesicomyidae are far from each other, and we do not know how bacteria pass from one to the other.

One could hypothesize that symbionts pass from gill to gonads through other tissues during early development. In *Riftia pachyptila* (Annelida, Siboglinidae), bacterial symbionts indeed colonize the developing tube of the settled post-larvae and enter the host through the skin, a process that continues through the early juvenile stages during which the trophosome is established from mesodermal tissue (Nussbaumer et al. 2006). There, bacteria penetrate and cross several tissues in which they will not be retained. Alternatively, because both gonad and gill are epithelial tissues, a broad contamination of epithelia might occur at an

early stage, and the bacteria are retained only in the gill and gonad. In this case, bacteria never occur in any other internal tissue. Wide infection of epithelium is for example reported in juvenile *Bathymodiolus puteoserpentis* and *B. azoricus* mussels (Wentrup et al. 2013).

However, our results on *Isorropodon* larvae suggest that bacteria are restricted to the gill epithelium as early as the post-larval stage (~200 μm shell length, see Fig. 3c). Symbiont translocation may have already occurred at the veliger stages during dispersion before the settlement of the post-larvae. This evidence of transmission seems to be very difficult to document in larvae of deep-sea bivalves. Due to their small size, we could identify neither gonad tissue nor the sex of animal.

A third possibility for symbiont translocation would be that bacteria are released from the gill epithelium into the pallial cavity and then enter the female gonad through the genital duct. In this case, the mechanism could be similar to what is reported between the squid *Euprymna scolopes* and the marine luminous bacterium *Vibrio fischeri* (*reference*). In this association, the specialized light organs called crypts are colonized by only few bacteria which are recognized by the epithelium and allowed to pass though the pores and inoculate crypt spaces (McFall-Ngai 2000). In the case of *I. bigoti*, the parental gill symbiont would be always transmitted maternally to the progeny if we consider the first hypothesis. In the second situation, acquisition of nonparental bacteria would be possible if free-living forms occur in the environment and are able to establish in the epithelia. The third situation is more complex. If bacteria pass through the pallial cavity, then the gill symbiont would be the most likely transmitted because it is a dominant bacterium in the pallial cavity, but it is not impossible that another vesicomyid symbiont present could enter the mantle cavity and colonize gonads instead of the maternal one. This could occur in particular when several Vesicomyidae species cooccur in a single aggregate (Decker et al. 2013). In all cases, the possibility of additional secondary, postfertilization, acquisition of symbionts must be further investigated.

Evolutionary consequences of symbionts in female gonads

Environmentally acquired symbionts are assumed to derive from a genetically diverse free-living population. In this case, selection can freely act against deleterious alleles that have arisen by chance in the symbiont genome, and the risk of their accumulation is lower (Funk et al. 2001; Moran 1996; Ohta 1973). In transovarial inheritance, only few symbionts seem to be transmitted within a given oocyte, which produces a bottleneck. Limited populations and transmission bottlenecks lead to accelerated evolution and to symbiont genome reduction (McCutcheon and Moran 2012; Peek et al. 1998; Kuwahara et al. 2007; Newton et al. 2007). Recent genome sequencing of two vesicomyid symbionts suggests that the symbiont genome (~1.1 Mb) has experienced some level of size reduction (Kuwahara et al. 2007; Newton et al. 2007).

We herein present strong evidence for maternal transmission of symbionts in *I. bigoti*, although the fate of bacteria from fertilization to larval settlement remains to be documented. This transmission mode does not exclude additional acquisition of laterally transmitted bacteria. Indeed, recent work has emphasized the existence of occasional lateral transmission in some Vesicomyidae. The phylogenetic trees of symbionts that are exclusively vertically transmitted are congruent with those of their hosts over long evolutionary time (Peek et al. 1998). However, a comparative analysis of three *Vesicomya* sp. genes from hydrothermal vents at the Juan de Fuca Ridge, with four symbiont loci revealed unexpected symbiont phylotypes occurring at low frequencies and highly divergent from previously described symbionts of the same host lineage (Stewart et al. 2008). Recently, it was shown that when two phylogenetically distant vesicomyid species, *Christineconcha regab* and *Laubiericoncha chuni*, cooccur at a given aggregate in the Gulf of Guinea, each species harbored its symbiont plus a few bacteria corresponding to the symbiont of the other species in their gills (Decker et al. 2013). These studies do not confirm whether the unexpected, nonparental, symbionts can actually be transmitted to the progeny. For this, the presence of these lineages should be investigated in gonad tissue.

Conclusions

Bacterial symbionts of *I. bigoti*, a gonochoristic bivalve from the Guiness cold seep site, occur within female gonad cells at all stages of gamete differentiation from germ cells to mature oocytes. They are completely absent from the male gonad and gametes. Post-larvae (200-μm shell length) display low amounts of these bacteria in their gills. This study strongly suggests the transovarial inheritance of symbionts within family Vesicomyidae. Future studies should attempt in vitro fertilization experiments and investigate larval development to test the possibility of additional postfertilization symbiont acquisition.

Acknowledgments We thank the captain and crew of RV *Pourquoi Pas?*, the ROV *Victor 6000* team (Ifremer, France), and Karine Olu, chief scientist of the WACS cruise. We thank Magali Zbinden for her help with TEM sample preparation, and Sven Laming for larvae sorting within CHEMECOLIs (AMEX, UPMC). We thank Nika Pende (University of Vienna) for her help with CARD-FISH. We thank the Cell Imaging facility of IFR83 (UPMC, France) for technical support with microscopy. The facility is supported by the "Conseil Regional Ile-de-France". This research was supported by UPMC, ANR DeepOases, CHEMECO EuroDEEP ESF, GDRE Ecchis, and ITN Symbiomics. Kamil Szafranski was funded through a Ph.D. grant from the Marie Curie Actions Initial Training Network (ITN) SYMBIOMICS.

Conflict of interest The authors have declared that no competing interests exist.

References

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

Amann R, Springer N, Ludwig W, Gortz H, Schleifer K (1991) Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. Nature 351:161–164

Beninger PG, LePennec M (1997) Reproductive characteristics of a primitive bivalve from a deep-sea reducing environment: giant gametes and their significance in *Acharax alinae* (cryptodonta: Solemyidae). Mar Ecol-Prog Ser 157:195–206

Bennett B, Smith C, Glaser B, Maybaum H (1994) Faunal community structure of a chemoautotrophic assemblage on whale bones in the deep northeast pacific-ocean. Mar Ecol-Prog Ser 108:205–223

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

Cary SC (1994) Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. Mol Mar Biol Biotech 3:121–130

Cary S, Giovannoni S (1993) Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. Proc Natl Acad Sci U S A 90:5695–5699

Cavanaugh CM (1983) Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. Nature 302:58–61

DeChaine EG, Bates AE, Shank TM, Cavanaugh CM (2006) Off-axis symbiosis found: characterization and biogeography of bacterial symbionts of *Bathymodiolus* mussels from Lost City hydrothermal vents. Environ Microbiol 8:1902–1912

Decker C, Olu K, Arnaud-Haond S, Duperron S (2013) Physical proximity May promote lateral acquisition of bacterial symbionts in vesicomyid clams. PLoS ONE 8:e64830. doi:10.1371/journal.pone.0064830

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

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

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

Duperron S, Rodrigues CF, Léger N, Szafranski K, Decker C, Olu K, Gaudron SM (2012) Diversity of symbioses between chemosynthetic bacteria and metazoans at the Guiness cold seep site (Gulf of Guinea, West Africa). MicrobiologyOpen 1:467–480

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

Funk DJ, Wernegreen JJ, Moran NA (2001) Intraspecific variation in symbiont genomes: bottlenecks and the aphid-*Buchnera* association. Genetics 157:477–489

Gaudron SM, Pradillon F, Pailleret M, Duperron S, Le Bris N, Gaill F (2010) Colonization of organic substrates deployed in deep-sea reducing habitats by symbiotic species and associated fauna. Mar Environ Res 70:1–12

Goffredi S, Hurtado L, Hallam S, Vrijenhoek R (2003) Evolutionary relationships of deep-sea vent and cold seep clams (Mollusca: Vesicomyidae) of the "*pacifica/lepta*" species complex. Mar Biol 142:311–320

Gómez-Valero L, Silva FJ, Simon JC, Latorre A (2007) Genome reduction of the aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola* in a recent evolutionary time scale. Gene 389:87–95

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

Gros O, Liberge M, Heddi A, Khatchadourian C, Felbeck H (2003) Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (Thalassia testudinum environment). Appl Environ Microbiol 69:6264–6267

Heyl TP, Gilhooly WP, Chambers RM, Gilchrist GW, Macko SA, Ruppel CD, Van Dover CL (2007) Characteristics of vesicomyid clams and their environment at the Blake Ridge cold seep, South Carolina, USA. Mar Ecol-Prog Ser 339:169–184

Imhoff JF, Sahling H, Sling J, Kath T (2003) 16S RDNA-based phylogeny of sulphur-oxidising bacterial endosymbionts in marine bivalves from cold-seep habitats. Mar Ecol-Prog Ser 249:39–51

Kim YW, Yasuda M, Yamagishi A, Oshima T, Ohta S (1995) Characterization of the endosymbiont of a deep-sea bivalve, *Calyptogena soyoae*. Appl Environ Microbiol 61:823–827

Krueger DM, Gustafson RG, Cavanaugh CM (1996) Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). Biol Bull 190:195–202

Krylova EM, Sahling H (2006) Recent bivalve molluscs of the genus *Calyptogena* (Vesicomyidae). J Mollus Stud 72:359–395

Krylova EM, Sahling H (2010) Vesicomyidae (Bivalvia): current taxonomy and distribution. PLoS ONE 5:e9957. doi:10.1371/journal.pone.0009957

Kuwahara H, Yoshida T, Takaki Y et al (2007) Reduced genome of the thioautotrophic intracellular symbiont in a deep-sea clam, *Calyptogena okutanii*. Curr Biol 17:881–886

Le Pennec M, Beninger PG (2000) Reproductive characteristics and strategies of reducing-system bivalves. Comp Biochem Phys A 126:1–16

Lisin SE, Hannan EE, Kochevar RE, Harrold C, Barry JP (1997) Temporal variation in gametogenic cycles of vesicomyid clams. Invertebr Reprod Dev 31:307–318

McCutcheon JP, Moran NA (2012) Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. Nat Rev Microbiol 10:13–26

McFall-Ngai MJ (2000) Negotiations between animals and bacteria: the "diplomacy" of the squid-vibrio symbiosis. Comp Biochem Phys A 126:471–480

Moran NA (1996) Accelerated evolution and Muller's rachet in endosymbiotic bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 93:2873–2878

Newton ILG, Woyke T, Auchtung TA et al (2007) The *Calyptogena magnifica* chemoautotrophic symbiont genome. Science 315:998–1000

Newton ILG, Girguis PR, Cavanaugh CM (2008) Comparative genomics of vesicomyid clam (Bivalvia: Mollusca) chemosynthetic symbionts. BMC Genomics 9:585

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

Ohta T (1973) Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. Nature 246:96–98

Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G (2002) The simple Fool's Guide to PCR, version 2.0. Department of Zoology, Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu

Peek AS, Feldman RA, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1998) Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. Proc Natl Acad Sci U S A 95:9962–9966

Rodrigues C, Cunha M, Olu K, Duperron S (2012) The smaller vesicomyid bivalves in the genus *Isorropodon* (Bivalvia, Vesicomyidae, Pliocardiinae) also harbour chemoautotrophic symbionts. Symbiosis 56:129–137

Scheltema RS, Williams IP (2009) Reproduction among protobranch bivalves of the family Nuculidae from sublittoral, bathyal, and

abyssal depths off the New England coast of North America. Deep Sea Res II 56:1835–1846

Schönhuber W, Fuchs B, Juretschko S, Amann R (1997) Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. Appl Environ Microbiol 63:3268–3273

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

Stewart FJ, Young CR, Cavanaugh CM (2009) Evidence for homologous recombination in intracellular chemosynthetic clam symbionts. Mol Biol Evol 26:1391–1404

Tyler PA, Marsh L, Baco-Taylor A, Smith CR (2009) Protandric hermaphroditism in the whale-fall bivalve mollusc Idas washingtonia. Deep Sea Res II 56:1689–1699

Von Cosel R, Salas C, Høisæter T (2001) Vesicomyidae (Mollusca: Bivalvia) of the genera Vesicomya, *Waisiuconcha*, *Isorropodon* and *Callogonia* in the eastern Atlantic and the Mediterranean. Sarsia 86:333–366

Wallner G, Amann R, Beisker W (1993) Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. Cytometry 14:136–143

Wentrup C, Wendeberg A, Huang JY, Borowski C, Dubilier N (2013) Shift from widespread symbiont infection of host tissues to specific colonization of gills in juvenile deep-sea mussels. ISME J 7:1244–1247

Won YJ, Hallam SJ, O'Mullan GD, Pan IL, Buck KR, Vrijenhoek RC (2003) Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus*. Appl Environ Microbiol 69:6785–6792

Annexe 1

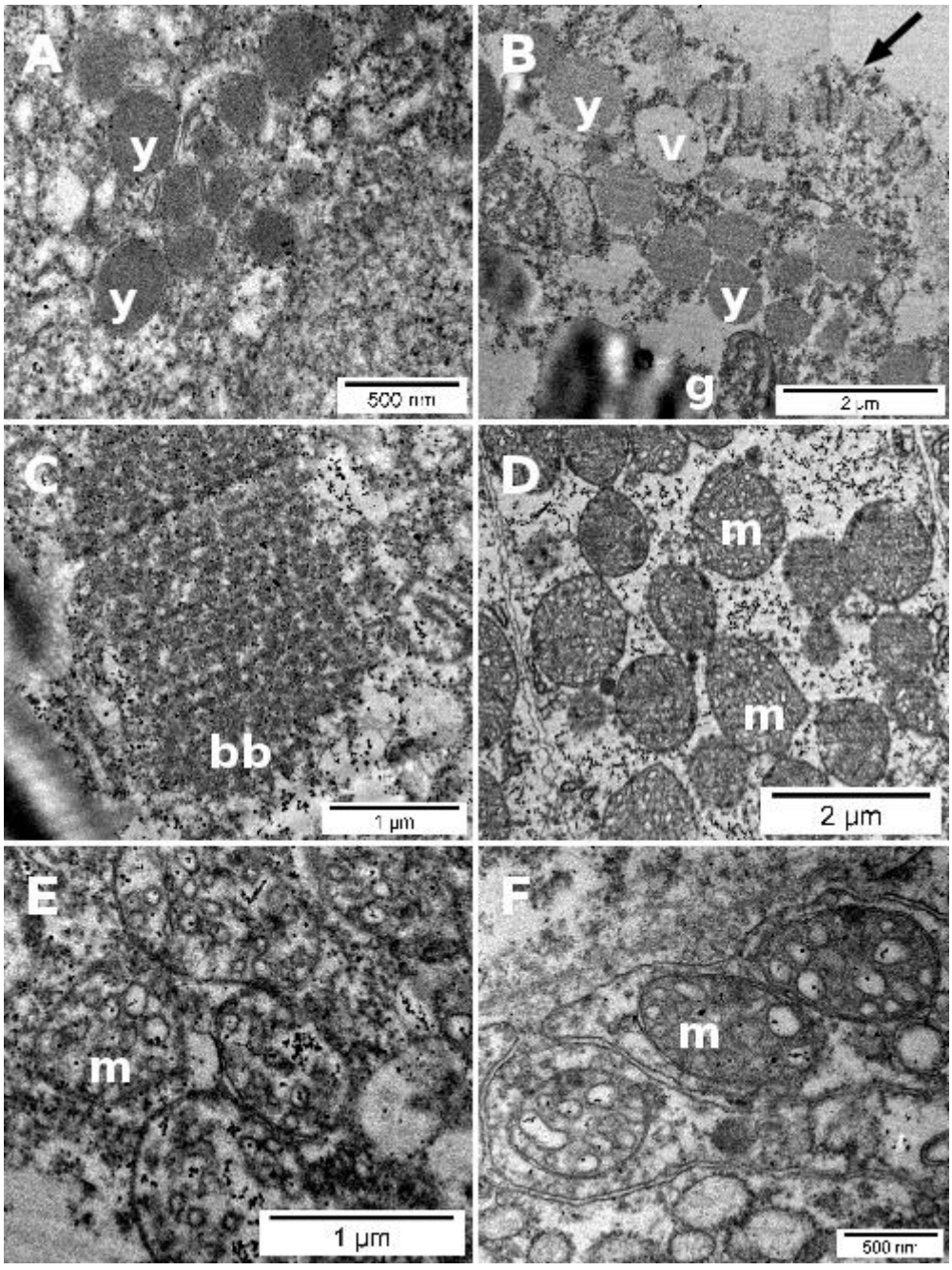


Figure 6-2: Figure S1: Transmission electron micrographs of *Isorropodon bigoti* ovary tissues. **A** Cross-section through the vitellogenic oocyte cytoplasm containing electron-lucent vesicles Yolk granules (y). **B** Details of the mature oocyte's ultrastructure: Yolk granules (y), electron lucent vesicles (v) and the microvilli (black arrow) projections in the outer membrane oocyte. **C** Cloud-like granules (Balbiani bodies) in the ooplasm of mature oocyte. **D-F** Transmission electron micrographs of mitochondria (m) in Isorropodon bigoti gametes: **D** Mitochondria in the germ cell. **E** Degenerating mitochondria in vitellogenic oocytes. **F** Degenerated mitochondrium in exocytosis in mature oocyte. Source :(Szafranski *et al.*, 2014)

Annexe 2

La même approche méthodologique que dans l'article scientifique 2 (Szafranski *et al.*, 2014) a été employée pour tester le mode de transmission des symbiontes chez deux autres espèces : *Idas modiolaeformis* (Bivalves, Mytilidae) de la Méditerranée orientale et *Thyasira* sp. (Bivalves, Thyasiridae) du golfe de Guinée. *I. modiolaeformis* attachés aux bois coulés ont été échantillonnés dans le volcan de boue Amon (1158 m de profondeur) en Méditerranée de l'Est pendant la mission MSM13_3/4 en 2009 (Gaudron *et al.*, 2012). Les spécimens de *Thyasira* sp. ont été trouvés dans les sédiments du site Guiness (582 m de profondeur) pendant la mission WACS en 2011 (Duperron *et al.*, 2012). Les sondes fluorescentes spécifiques pour les symbiontes d'*I. modiolaeformis* IMedM-138 (5'-ACCATGTTGTCCCCCACTAA-3') et de *Thyasira* sp. GAM42 (5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3'), ainsi que la sonde ciblant toutes les bactéries EUB-338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') appliquées sur les coupes histologiques des tissus de spécimens analysés auparavant (Gaudron *et al.*, 2012; Duperron *et al.*, 2012) ont été utilisées dans cette expérience.

Cette approche consiste à vérifier, en utilisant les méthodes de FISH et CARD-FISH avec les sondes spécifiques et générales, si les symbiontes chimiotrophes sont présents dans les gonades et dans les gamètes femelles de ces deux espèces. Dans le cas d'*I. modiolaeformis* ce test a été fait auparavant avec la technique du FISH et les symbiontes n'ont pas été détectés dans ses gamètes (Gaudron *et al.*, 2012). La transmission des bactéries symbiotiques n'a pas été analysée chez les bivalves de la famille des Thyasiridae. La technique de CARD-FISH est plus sensible que le FISH classique, mais une seule sonde à la fois ne peut être appliquée sur une coupe donnée (Pernthaler *et al.*, 2002). Les signaux observés sont en général plus flous, car la fluorescence est induite par une réaction enzymatique avec la peroxydase du raifort (Horseradish Peroxidase – HRP) dont le produit fluoresce. Néanmoins, cette approche permet d'identifier, avec plus de certitude, des bactéries symbiotiques dans les gamètes et les gonades. Si les signaux sont détectés, la technique du FISH classique est utilisée et les images de meilleures qualités sont acquises au microscope confocal.

Malgré la détection des signaux de fluorescence dans les branchies des deux espèces (Figure 6-3), la présence des symbiontes n'a été confirmée ni dans les tissus reproductifs ni dans les gamètes d'*I. modiolaeformis* (Figure 6-4). Chez *Thyasira* sp. les bactéries

symbiotiques ont été visualisées dans l'épithélium entourant la gonade, mais pas dans les ovocytes mêmes (Figure 6-5). Ces résultats confirment la transmission horizontale des symbiontes chez les Bathymodiolinae, comme postulé par Gaudron et collaborateurs (2012). L'acquisition des symbiontes par l'environnement a probablement lieu chez les Thyasiridae, avec la possibilité d'inoculation maternelle des ovocytes mûrs au moment de la ponte, par exemple. Des analyses supplémentaires par la microscopie électronique sont nécessaires pour préciser la localisation intra- ou extracellulaire des symbiontes dans cette région.

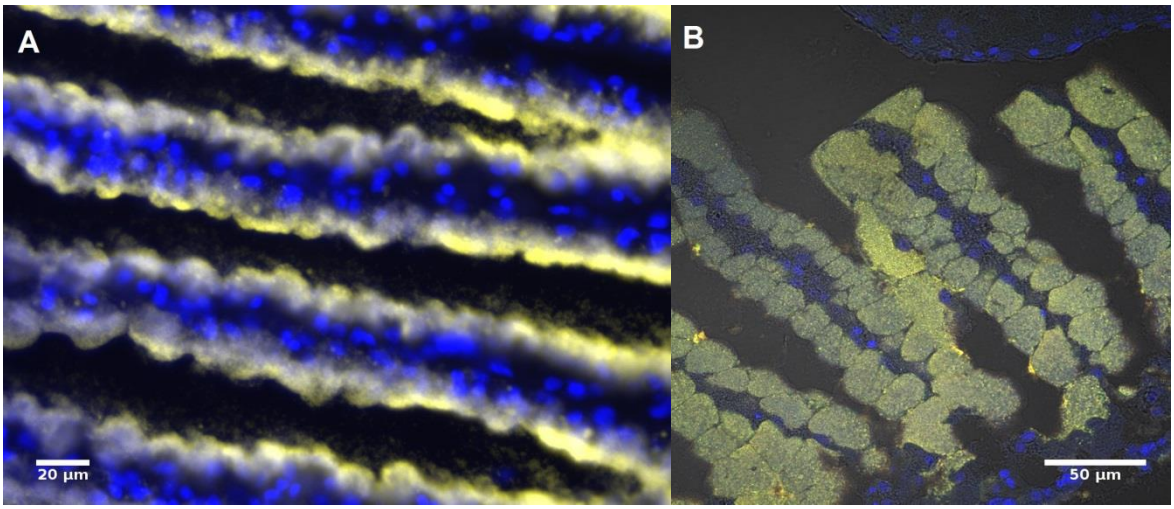


Figure 6-3 : A : Photo au microscope à fluorescence des filaments de branchie d'*Idas modiolaeformis*. En bleu les noyaux colorés en DAPI, en jaune le signal de la sonde fluorescente IMedT2 spécifique des symbiontes méthanotrophes des Mytilidae. B : Photo au microscope confocal des filaments de branchie de *Thyasira* sp. En bleu les noyaux colorés en DAPI, en jaune le signal des sondes fluorescentes GAM42 et EUB338 révélant des symbiontes de *Thyasira* sp. Source : figure originale

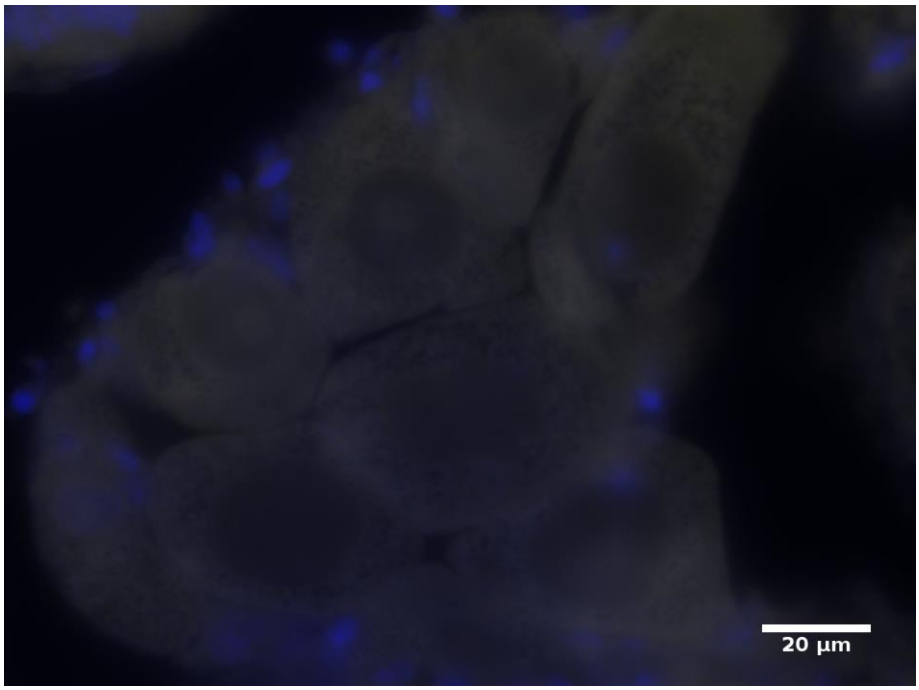


Figure 6-4 : Photo au microscope à fluorescence de la gonade femelle d'*Idas modiolaeformis*. En bleu les noyaux colorés en DAPI, le signal de la sonde fluorescente IMedT2 spécifique des symbiontes méthanotrophes des Mytilidae est absent. Source : figure originale

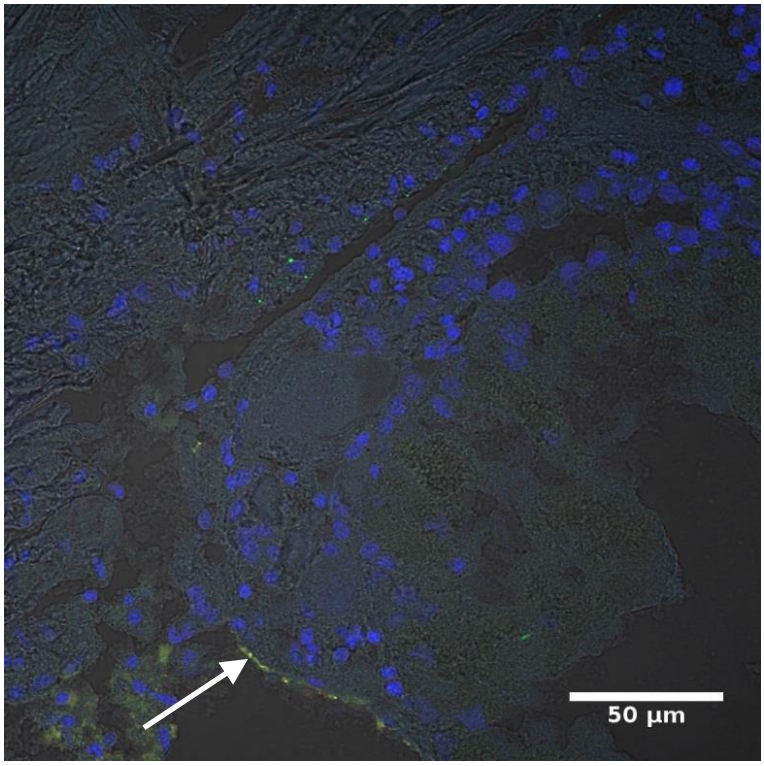


Figure 6-5 : Photo au microscope confocal de la gonade femelle de *Thyasira* sp. En bleu les noyaux colorés en DAPI, en jaune le signal des sondes fluorescentes GAM42 et EUB338 révélant des symbiontes de *Thyasira* sp au niveau de l'epithélium (flèche blanche). Le signal spécifique des symbiontes n'est pas détecté dans les gamètes. Source : figure originale

7. Article scientifique 3 « First insights into the population dynamics of methane- and sulfur-oxidizing symbionts in *Bathymodiolus azoricus* under pressure »

Les résultats obtenus dans ce volet de ma thèse n'ont pas encore été publiés car ils nécessitent d'être complétés par une quantification des symbiontes dans les tissus de l'animal par la PCR quantitative. Suite à des problèmes d'optimisation des amorces, ces travaux n'ont pas pu être terminés avant la rédaction du manuscrit, mais ils seront repris après la soutenance. Ce manuscrit, sous la forme d'article scientifique sera modifié et complété avant la soumission éventuelle. Les figures et les tableaux sont présentés après le texte principal.

Résumé

La moule *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia : Mytilidae) domine la faune au niveau des sites hydrothermaux situés non loin des Açores. Dans ses branchies, elle abrite des bactéries sulfo-oxydantes et méthanotrophes qui lui fournissent l'essentiel de son alimentation. D'après des études précédentes, il semblerait que ce système symbiotique puisse s'adapter à des changements de son environnement en ajustant le rapport entre les bactéries sulfo-oxydantes et méthanotrophes. Mais jusqu'à présent, ces moules qui vivent à des profondeurs entre 800 et plus de 2000 m, ont toujours été remontées sans conserver la pression du fond. Suivant les sites, cette décompression rapide peut être plus ou moins violente pour l'animal. Pour la première fois lors de la campagne BioBaz 2013, des spécimens ont été remontés en gardant la pression du fond dans un aquarium mobile PERISCOP. Certains animaux ont été ensuite transférés et gardés sous pression dans les aquariums installés à bord (BALIST et IPOCAMP), subissant une exposition à des stress thermiques et chimiques. Grâce à la méthode 3D FISH, les volumes relatifs occupés par les deux types de bactéries dans les branchies peuvent être quantifiés. Un premier essai de quantification des abondances relatives de symbiontes par 454 pyroséquençage de l'ARNr 16S a aussi été réalisé. Dans cette étude, l'optimisation du protocole 3D FISH a permis d'augmenter le nombre d'individus analysés. Il a été constaté qu'il n'existe pas de différence significative entre des spécimens remontées sous la pression du fond ou non, y compris sur le site Rainbow, le plus profond. Aucune différence n'a été observée entre les régions antérieure et

postérieure des branchies au sein d'un spécimen analysé. Une légère baisse dans le ratio sulfo-oxydants/méthanotrophes a été observée suite à une augmentation de la température de l'eau simulant l'exposition temporaire à un fluide chaud. Après une exposition à des concentrations élevées de sulfures, la quantité de bactéries sulfo-oxydantes a doublé dans les bactériocytes des moules. En présence de bicarbonate de sodium (source de carbone des bactéries sulfoxydantes) le volume de bactéries sulfo-oxydantes a augmenté, ce qui suggère qu'il existe une autre voie d'entrée du carbone dans le cycle de Calvin. Cette étude confirme que la remontée sans garder la pression du fond n'altère pas le volume relatif des bactéries sulfo-oxydantes/méthanotrophes. En revanche, la réponse aux variations des paramètres de l'environnement est plus rapide et de plus grande ampleur quand les moules restent à leur pression native. Les mêmes tendances ont été confirmées par pyroséquençage, validant cette méthode pour ce type d'analyse. Cette étude a permis d'améliorer la procédure de quantification des symbiontes et sera par la suite utilisée pour les échantillons de la mission BICOSE 2014. Elle démontre la facilité de *Bathymodiolus azoricus* et de ses symbiontes à s'adapter aux conditions difficiles et changeantes régnant dans l'habitat hydrothermal. Cette symbiose double et flexible est probablement à l'origine du succès de cette moule sur les sites hydrothermaux de l'Atlantique.

Manuscrit proposé

First insights into the population dynamics of methane- and sulfur-oxidizing symbionts in *Bathymodiolus azoricus* under pressure

Abstract

The deep-sea mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae) dominates hydrothermal-vent macrofauna within the vicinity of the Azores region. The gills house methane- and sulphur-oxidizing bacteria that fulfil most of the mussel's nutritional requirements. Previous studies indicate that the ratio between methane- and sulphur-oxidizing bacteria in these Mytilidae, reflect the availability of electron donors in their environment. To date, the sampling of these mussels from depths between 800 to in excess of 2000m, have been performed without hyperbaric chambers, and deeper sites involved greater degrees of decompression. For the first time during the BioBaz 2013 cruise, specimens were recovered on board under pressurised conditions equivalent to that of their native habitat using a dedicated device, the PERISCOP, and some were transferred into pressurized vessels (BALIST and IPOCAMP), and exposed to temperature stress and various chemical conditions. Employing 3D FISH, relative volumes occupied by both types of symbiotic bacteria in the gills were measured, and preliminary tests were performed applying a 454 pyrosequencing technique. Optimization of the 3D FISH protocol has increased the number of individuals analysed, strengthening statistical supports for comparison compared to previous studies. We found no within-site differences between bacterial abundances in specimens recovered with or without the isobaric chamber, and no difference between the anterior and posterior regions for the gill within a given specimen. Relative abundances at the Menez Gwen and Rainbow sites were different, and resembled abundances measured on mussels sampled in 2006. A small change in the ratio of methane- to sulphur-oxidizing bacteria was observed in response to thermal stress. Sulphur-oxidising bacteria abundances increased when exposed to elevated sulphide levels. In the presence of sodium bicarbonate alone, the abundance of sulphur-oxidizing bacteria also increased, suggesting an alternative energy source than sulphide. This study confirms that non-pressurized recovery does not significantly alter relative abundances of symbionts, and that trends in symbiont dynamics previously observed in mussels kept at ambient pressure are even amplified when mussels are kept at their native pressure and temperature.

Keywords: abiotic stress; 3D FISH; hydrothermal vents; pressurized recovery; pyrosequencing; symbiosis; symbiont quantification;

Introduction

Most of known ecosystems are driven by photosynthesis-based primary production. In the deep-sea, underneath the photic zone, many oases of life, full of rich metazoan communities, have been found around the hydrothermal vents (Corliss *et al.*, 1979.) Only a very small fraction of euphotic primary production reaches greater depths by sedimentation or advective transport (Karl *et al.*, 1980). Hydrothermal vents, observed at great depths along the mid-ocean ridges above the divergent tectonic plates or in back-arc basins above the subduction zones emit very hot fluids containing (among others) hydrogen sulphide, dihydrogen and sometimes methane (Van Dover, 2000; Van Dover *et al.*, 2002). Although these compounds are toxic for animals, symbiotic sulfur-oxidizers use the hydrogen sulphide from the fluids as the source of energy for their metabolism and fix inorganic carbon (Cavanaugh *et al.*, 1988). On the other hand methane-oxidising bacteria use methane both as a carbon and an energy source (Childress *et al.*, 1986; Cavanaugh *et al.*, 1992). Organic carbon compounds are subsequently transferred to their animal host and ultimately fuel the whole ecosystem (Cavanaugh, 1983).

Bathymodiolinae mussels (family Mytilidae) are the typical fauna colonizing hydrothermal vents and cold seeps around the world (Von Cosel *et al.*, 1999; Desbruyères *et al.*, 2000). *Bathymodiolus puteoserpentis and B. azoricus*, from the Mid-Atlantic Ridge (MAR), were shown to possess two physiologically and phylogenetically distinct symbiont populations in their gill bacteriocytes, on the basis of ultrastructural studies, 16S rRNA sequence analyses, and enzyme assays (Cavanaugh *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1993; Distel *et al.*, 1995; Fiala-Medioni *et al.*, 2002). *B. puteoserpentis* and *B. azoricus* mussels share in their gill bacteriocytes the same small sulphur-oxidising bacteria and larger methanotrophs with typical stacked internal membranes based on their 16S rRNA phylotypes (Duperron *et al.*, 2006).

The existence of a dual symbiosis could increase environmental tolerance of hosts, because environmental conditions may impose a balance between the physiological activities of different symbiont populations associated with these mussels (Fiala-Medioni *et al.*, 2002). The disappearance of bacteria from *B. azoricus* gill bacteriocytes was observed in animals subjected to starvation in sulphide-free seawater, and symbionts were re-acquired in turn when mussels were cultured in sulphide-enriched aquariums (Kádár *et al.*, 2005). By using

3D fluorescence *in situ* hybridization (3D FISH), it has been shown that the relative volume occupied by each *B. azoricus* symbiont type present within a bacteriocyte varies within and between vent sites (Halary *et al.*, 2008). The hypothesis that vent chemistry influences symbiont ratios has been tested on *B. azoricus* mussels maintained in a controlled laboratory environment at atmospheric pressure with one, both or none of the chemical substrates necessary for chemosynthesis-based energy production by endosymbionts (Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008, 2010). Animals used in these studies were all either from shallower vent sites (*i. e.* Menez Gwen) and cultured in the laboratory conditions (Kádár *et al.*, 2005; Riou *et al.*, 2008) or recovered from deeper sites and dissected immediately upon recovery (Lucky Strike mussels in Halary *et al.*, 2008). In all cases, specimen recovery involved a rapid pressure loss, and *in vivo* experiments were done on highly stressed specimens. Results from these studies were thus hampered by possible artefacts resulting from the recovery stress, and it remains to be proven that symbiont population dynamics documented in *in vivo* experiments were not the consequence of these stresses rather than reflecting real biological responses.

In the present study we quantify the two phylotypes of symbiotic bacteria in gill bacteriocytes of *Bathymodiolus azoricus* recovered for the first time at their native pressure and temperature thanks to PERISCOP (Shillito *et al.*, 2008) isobaric recovery vessels. Specimens were subsequently exposed *in vivo* to abiotic stresses inside pressurized vessels IPOCAMP and BALIST (Shillito *et al.*, 2014). Relative abundances of methane- and sulphur-oxidizing symbionts in gills were compared by means of FISH and image analysis. In order to optimize the approach, we compared results from three FISH-based approaches, and images acquired from the anterior and posterior regions of the gills. We then compared isobaric vs. non-isobaric recovery and the effect of site of origin, and of the various treatments applied to live specimens. Results shed a new light on both the methods to investigate symbiont dynamics in animal tissue, and on the dynamics of symbiont populations in hydrothermal vent mussels.

Material and methods

Sampling, collection, and sample recovery

Bathymodiolus azoricus mussels (Bivalvia, Vesicomyidae) (Von Cosel *et al.*, 1999) were collected in August 2013 from three hydrothermal vent sites during the BioBaz 2013 cruise to the Mid-Atlantic Ridge (MAR) aboard RV Pourquoi Pas? using ROV Victor 6000, dives 515-523). Mussels were collected from Menez Gwen (37°50.669N 31°31.156W) at the MG2 point (830m depth); Lucky Strike (37°17.349N 32°16.536W) site at Tour Eiffel point (1690m depth) and Rainbow (36°13.766N 33°54.117W) site at 'France 5' point (2270m depth). Animals were sampled from the basis of smokers. Active vents were colonized by fauna typical for MAR vents, including one bivalve (*Bathymodiolus azoricus*) and three shrimp species (*Rimicaris exoculata, Mirocaris fortunata and Chorocaris chacei*) (Desbruyères *et al.*, 2001).

Two methods for sample recovery from each vent site were used: a pressurised recovery with a sampling system named PERISCOP (Shillito *et al.*, 2008) in which animals arrive to the surface at natural pressure and temperature, and non-pressurised recovery in watertight BioBoxes in which they experienced pressure decrease and temperature increase during recovery. In pressurized recovery, mussels were collected into a dedicated *in situ* sampling cell called CROCO, thus their number was limited by the space available. In total 50 specimens of *B. azoricus* were analysed (40 recovered at their natural pressure in the PERISCOP device and 10 with decompression in BioBoxes). Details on sampling sites and number of specimens analysed are provided in Table 1.

Heat-shock on board experiments

Nine mussels recovered in PERISCOP from Lucky Strike were transferred to BALIST pressurized aquarium without loose of pressure, as described before by Ravaux *et al.* (2013). Animals were incubated at native pressure and 9°C during 2 h with fresh filtered sea-water circulation, prior to heat-shock of 1 h at the sub-lethal temperature of 25°C (Boutet *et al.*, 2009). Afterwards, they stayed in the BALIST aquarium during 2 hours at 10°C. Finally, mussels were dissected immediately.

Chemical exposures on board experiments

Mussels from Rainbow recovered in the PERISCOP device were decompressed for 2-3 minutes on board in order to transfer them into one litre Nalgene™ bottles filled with either

11.8 µM $NaHCO_3$ and 36.4 µM Na_2S; only 11.8 µM $NaHCO_3$; or filtered sea-water (control). Bottles were closed tightly and re-pressurized immediately in BALIST or IPOCAMP aquariums and incubated at 8°C for 5 h. At the end, mussels were dissected immediately. An additional control consisted on mussels left in sea-water in a cold room at ambient pressure during the whole experiment.

Sample fixation

Samples were dissected on board at 4°C. Anterior and posterior parts of gill tissue as well as fragments of foot were conserved separately for further investigations. Tissues of interest were fixed on board for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments, using 4 % formaldehyde in twice-filtered seawater (TFSW) (4 °C, 2–4 h), rinsed twice in TFSW and then dehydrated in a gradient of ethanol (50, 70 80, and 96 %). FISH-fixed samples were stored in 96% ethanol at 4°C on board, during the transport and in the laboratory. Tissues from the same specimens were fixed in parallel for nucleic acids extractions in liquid nitrogen then conserved at -80°C or on dry-ice during transit to the laboratory.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) and image acquisition

Fragments of gill tissues were embedded in polyethylene glycol distearate (PEG) : 1-hexadecanol (9:1) and cut on microtome (Thermo, Great Britain) to 8µm sections deposited on SuperFrost Plus slides (VVR, International, USA). After wax removal and tissue rehydration in decreasing ethanol series (96% → 70%), sections were hybridized for 1–3 h at 46°C in buffer containing 40% of formamide as previously described (Duperron *et al.*, 2008). "Slow Fade" reagent (Invitrogen) with DAPI was added to protect signal against bleaching and to stain the DNA, before mounting a coverslip. Three 16S rRNA-based specific probes were applied simultaneously on every section. FISH probes used are summarized in Table 2.

Slides were observed under a BX61 epifluorescence microscope (Olympus, Japan), image acquisition was made with ImagePro 6.0 software (Olympus, Japan). Acquisition of one image per gill section was done for classical (2D) FISH. Sequential acquisition of images every 0.3 µm within the thickness of the section was done for 3D FISH using a 100x objective (NA 1.3). Image stacks were analysed using ImageJ software (Abramoff *et al.*, 2004) and the total volume occupied by bacteria and respective proportions of each phylotype were computed for the whole section, and for 10 individual bacteriocytes per section using the SymbionJ plug-in (Halary *et al.*, 2008). 3D FISH image processing and relative symbiont quantification was performed as described before (Halary *et al.*, 2008). Briefly, the red

channel was attributed to EUB-338 probe (Amann *et al.*, 1990) signal allowing calculation of the total volume of symbionts in bacteriocytes, the green channel represented methanotrophs (Imed M-138 probe, Duperron *et al.*, 2008) and the blue one thiotrophs (Bang T-642 probe, Duperron *et al.*, 2005) (Figure 1, Table 2). Finally, ten random bacteriocytes from each slide were extracted manually from each 3D image and the mean relative abundances of each bacterial type were computed.

DNA extraction and molecular quantification of symbionts

Total DNA was isolated from gill tissue and foot fragments (negative control) with QIAGEN DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Holland), according to the manufacturer's instructions. The nucleic acids concentration and quality were checked on NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) and equilibrated to 200 ng/µL. Two to five biological replicates from each experiment were pooled and used for proportional symbiont quantification by 454 pyrosequencing. Degenerated forward primer V5V6_F (CAAAC**R**GGATTAGATACCC**Y**G) and reverse primer V5V6_R (CGTTRCGGGACTTAACCCAACA) targeting both methano- and thiotrophs were used to amplify the V5-V6 hypervariable region of bacterial 16S rDNA, corresponding to regions 770-1094 in the *E.coli* 16S rRNA-encoding gene. Short (~300bp) pyrotags were sequenced by 454 pyrosequencing (GsFLX-Roche Diagnostics, GENOSCREEN, France). Sequence were analysed as described before (Bachy *et al.*, 2013). Briefly, the resulting binary '.sff' files were extracted using Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Sequences shorter than 250 bp, longer than 350 bp and containing Ns were eliminated from further analysis. 454 sequencing errors and PCR single base errors were screened using the PyroNoise and SeqNoise modules of the AmpliconNoise software (Quince *et al.*, 2011) with default parameters. Sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs, function Fcluster) using the same software. The sequence abundance matrix was generated using Python scripts at 97% identity thresholds for Operational Taxonomic Unit (OTU) definition and four best hits (maximal e-value=$1e^{-10}$) for each OTU were found using BLAST (Altschul *et al.*, 1997) using the SSURef_NR99_115 Silva database (Quast *et al.*, 2013). OTUs with less than 5 sequences in total were eliminated.

Statistical analyses

Relative abundances of methanotrophs as percentages of the total volume occupied by bacteria were transformed to arcsinus values (Halary *et al.*, 2008) and then used for transformation-based redundancy analyses (tb-RDA). Sampling site (Menez Gwen and Rainbow), recovery mode (iso- versus non-isobaric), acquisition method (2D FISH-, 3D

FISH-, bacteriocyte-based), gill region (anterior versus posterior), specimen and stress type were used as factors into the constrained RDAs, in order to estimate their contribution to the global variance. Significance was assessed using permutation tests. Shapiro-Wilk tests were performed on data used for pairwise comparisons to check the normality of distribution, but as data did not follow the normal distribution, non-parametric tests (Wilcoxon test for 2 class factors and Kruskal-Wallis test for 3 or more class factors) were then used for comparisons of the relative percentage of the methanotrophs volume in different classes of factors. All statistical analyses were performed using R (R Development Core Team, 2013).

Results

Image acquisition methodology

In order to optimize the 3D FISH method (Halary *et al.*, 2008) different ways of image acquisition and analysis were tested. For each mussel specimen, 10 acquisitions were done in 2D FISH, 10 in 3D FISH, and 10 mean values of 10 randomly chosen bacteriocytes from 3D FISH images (=100 bacteriocytes per specimen). As an example, the analysis of anterior gill tissue from 7 specimens recovered non-isobaric from Menez Gwen showed that the mean volume occupied by methanotrophs (MOX), measured with 2D FISH method, was 47.2% ± 5.4 (mean ± standard deviation), for 3D FISH it was 46.5% ± 5.8 and for bacteriocytes 48.1% ± 3.8 (Figure 2). All results of this comparison are included in Table 3. A Kruskal-Wallis test made on all measurements (anterior and posterior gill tissue) for these three methods has shown that there was no significant difference between results from 2D, 3D and bacteriocytes (p-value = 0.09).

The influence of gill region

Gills are growing in their posterior zone. We tested whether there was a significant difference in the relative volume of both bacterial phylotypes between anterior and posterior regions of gill tissue. These two regions were analysed in 12 specimens with 2D and 3D FISH, yielding in total 480 measurements (Table 3, Table 4). A Mann-Whitney-Wilcoxon test did not reveal any significant difference in the relative volume of occupied by MOX between the anterior and posterior region (p-value = 0.64). Subsequent analyses were made only on anterior part of gills.

Isobaric versus non-isobaric recovery

Mussels colonizing the three sites analysed in this study are exposed to different pressures (about 83 bars at Menez Gwen, 170 bars at Lucky Strike and 230 bars at Rainbow), but both suffer significant pressure variation when brought on board. Thanks to the pressurized recovery device PERISCOP, mussels can now be recovered in their native conditions. The relative volume occupied by MOX was compared for the two types of recovery. Measurements made with 3D FISH on mussels from Menez Gwen showed for example that MOX represented 46.5% ± 5.8 of the total volume after non-isobaric recovery, while after the isobaric recovery in PERISCOP they occupied 44.3% ± 5.7 (Figure 2, Table 3). The respective values for animals from Rainbow were: 56.3% ± 6.4 and 56.3% ± 8.3 (Figure 2, Table 3). A Mann-Whitney-Wilcoxon test based on 1140 values (from anterior and posterior regions of the gills) showed no significant difference in MOX proportion between the two types of recovery (p-value = 0.12).

Comparison between sampling sites

Specimens recovered from Menez Gwen using Bioboxes showed a MOX percentage value of 46.5% ± 5.8, while Rainbow specimens displayed 56.3% ± 6.4 MOX. A similar diffzerence was seen between PERISCOP-recovered specimens from the two sites. Results are presented on Figure 2 and Table 3. Values at Menez Gwen and Rainbow were different (Mann-Whitney-Wilcoxon test, p-value = 0.00016). Unilateral test confirmed that methane-oxidizers occupied a higher fraction of the overall volume in bacteriocytes of *B. azoricus* from Rainbow.

Main factors influencing the relative abundances of symbionts

The influence of each factor mentioned above (acquisition method, gill region, recovery mode and sampling site) was assessed by redundancy analysis (RDA) and ANOVA permutation tests. Overall, our model could explain almost 56% of the total variance. The highest influence was due to sampling site (41%). Inter-individual differences were responsible for more than 14% of the total variance, while other factors explained much lower fractions of the observed variance: recovery mode (0.3%), acquisition method (0.3%) and gill region (0.004%) (Table 5).

High-temperature stress

Mussels recovered at Lucky Strike in PERISCOP were directly transferred to BALIST without de-pressurization. Control mussels that were not exposed to the 1h heat-shock at 25°C were recovered during another dive from exactly the same site, due to technical limitations. In

total 140 measurements were taken from 14 mussels (9 heat-shocked and 5 control) using the 2D FISH method (Figure 3, Table 6). MOX occupied a higher fraction of the volume in bacteriocytes of mussels subjected to the heat-shock (49.2% ± 8.5 against 43.0% ± 10.2 in the negative control; Mann-Whitney-Wilcoxon test, p-value = 0,000138).

Exposure to symbiont substrates

Each type of chemical exposure could be applied only to 2 specimens from the Rainbow site at once, because of the limited volume of Nalgene™ bottles (1L) and the limited number of bottles that could be incubated at once in pressurized vessels. Nevertheless, 2 different treatments ($NaHCO_3$ + Na_2S or $NaHCO_3$ alone) and 2 control experiments (sea-water, before and after the experiment) were done, yielding in total 320 measurements acquired with 2 methods (2D and 3D FISH) (Figure 4, Table 6). There was a significant difference between mussels incubated at high pressure (all treatments and control) and those left in atmospheric pressure in a cold room (Mann-Wilcoxon test, p-value = $3.86 * 10^{-12}$) while there was no difference between 2D and 3D FISH acquisition methods in this dataset (p-value = 0.54). Kruskal-Wallis tests were performed to test the differences between the different chemical treatments. Results obtained for most of the treatments differed significantly (p-values < 0.011). In mussels exposed to $NaHCO_3$ + Na_2S or to $NaHCO_3$ alone, a highly significant increase in relative volume of SOX was observed (90.1% ± 17.6 and 76.0% ± 23.0 respectively against 42.5% ± 7.6 in the control) (Figure 4, Table 6). Meanwhile, the volume of SOX slightly decreased in mussels incubated in filtered sea-water (38.5% ± 5.0). A RDA showed that the total variance was mainly explained by 'treatment' factor (68%), 18% explained the differences between specimens, and that only 0.4% was due to the method of image acquisition (Table 7).

Quantification by 454 pyrosequencing

17683 sequences passed all the quality tests and were distributed in 17 OTUs. In order to estimate the abundance of each bacterial phylotype, each OTU was attributed to one of the following bacterial types: SOX, MOX and others. Sequences of sulfur-oxidizers were the most abundant with 76.3% of sequences in the whole dataset, methanotrophs were represented by 20.8% of sequences, while other bacteria were rare (2.9% of the total number of sequences), mainly represented by Epsilonproteobacteria (Table 8). The two methods of bacterial quantification by 3D FISH and 454 pyrosequencing were compared by performing a regression of their respective values (Figure 5). The regression line was calculated ($f(x)=1.94x-88.58$) with $R^2=0.69$.

Discussion

Methodology for image acquisition

Three techniques of FISH image acquisition have been applied in our study: 2D FISH with one image per gill section, 3D FISH with image series taken every 0.3 µm within the thickness of the section and the mean of 10 random bacteriocytes based on 3D image and the mean relative abundances of each bacterial type within one host cell. They did not yield different results. Although the results are similar, they represent very distinct levels of time investment. The basic 2D FISH is the fastest, 3D FISH on whole-field of the microscope taking more time to acquire (Halary *et al.*, 2008). Even more time is required to manually isolate single bacteriocytes out from the 3D image and analyse the relative volumes of symbionts in them. If the aim is to maximize acquisitions, the 2D FISH is suitable as the less time-consuming. And if the best image quality is the priority, the three-dimensional models are recommended to be acquired on the confocal microscope. In this study we managed to analyse 50 specimens in total with two to three of these methods, while previous studies using the 3D FISH technique were based on only 3 to 20 individuals (Duperron *et al.*, 2007; Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008, 2010; Duperron *et al.*, 2011; Lorion *et al.*, 2012).

The sampling: isobaric versus non-isobaric recovery and localization in the gill

The ontogeny of the bivalve gill reveals that the growth of gill tissue in mytilid bivalves takes place in the posterior part (Cannuel *et al.*, 2009). We expected difference in symbiont relative abundances between the ‘new' posterior part and 'ancient' anterior one, but this was not confirmed by the data. On the other hand, it is likely that the absolute number of symbionts in each bacteriocyte is different in the respective gill regions. This advocates for measuring absolute numbers of symbionts, for example by q-PCR (Boutet *et al.*, 2009, 2011) or by 454 pyrosequencing.

As the three sites analysed in this work are placed at different depths (850m at Menez Gwen, 1700m at Lucky Strike and 2300m at Rainbow) one could hypothesize that the mussel recovery with rapid decompression might influence the ratio between symbionts. In the present study, for the first time, mussels were recovered under their natural pressure till the opening of PERISCOP vessel on board and prior to the imminent fixation, which took less than 10 minutes. We could thus compare the effect of isobaric and non-isobaric recovery mode and check whether the pressurized recovery impacts the results. Our measurements clearly indicate that the recovery mode does not influence the relative abundance of the two

bacterial phylotypes in gill bacteriocytes, even for the deepest site. This major finding validates, *a posteriori*, all previous studies that did use classical recovery methods involving pressure loss (Duperron *et al.*, 2006; Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008, 2010; Duperron *et al.*, 2011; Lorion *et al.*, 2012), and indicate that isobaric recovery is not necessary when investigating relative abundances and dynamics of symbiont populations. But, we must be careful when interpreting these results, because it does not mean that other physiological parameters like metabolic activity or host/symbiont gene expression patterns could have not been altered. This remains still to be checked by quantitative PCR on reverse-transcribed RNA or RNASeq techniques. Nevertheless, a difference in FISH signal intensities (not areas) could be observed for specimens recovered in PERISCOP and decompressed ones, in which the signal force was lower (data not shown). This could be explained by the loose of ribosomes (to which FISH probes attach), in the latters.

Site-related differences in symbiont abundances and their stability over time

Mussels were collected at three sites on Mid-Atlantic Ridge during the BioBaz 2013 cruise. The shallower Menez Gwen site is characterised by lower concentrations in methane in the vent fluid than the deeper Rainbow site, while sulphide concentrations are similar (Desbruyères *et al.*, 2000). The ratio between these two compounds has been shown to influence the relative MOX/SOX abundance, and Rainbow was where methanotrophs were more abundant than thiotrophs (Duperron *et al.*, 2006). Previous works have shown that SOX in mussels from Menez Gwen represented 53.1% ± 10.3 of the total volume of symbionts, and 39.4% at Rainbow (Halary *et al.*, 2008; Le Bris & Duperron, 2010). Our results are remarkably close to these previous results, with 52.3% ± 4.9 of SOX at Menez Gwen and 43.7 % ± 6.4 of SOX at Rainbow (Figure 2, Tables 3 and 4). Our results are thus coherent with the hypothesis that relative symbionts abundance depends on their respective substrates availability (Trask & Van Dover, 1999; Fiala-Medioni *et al.*, 2002; Riou *et al.*, 2008) and suggest a certain stability in site-related differences over time (Duperron *et al.*, 2006; Halary *et al.*, 2008).

Response to thermal stress under pressure

In this study, *B. azoricus* were for the first time recovered under their natural pressure and subjected to a heat-shock. Heat-shock has caused a significant decrease in the relative volume of SOX (from 57.0% ± 10.2 in the control to 50.9% ± 8.5) (Figure 3, Table 6). Previously, similar experiments were done on *B. azoricus* mussels from Menez Gwen recovered and maintained at ambient pressure in the laboratory (Boutet *et al.*, 2009). Authors have focused

on the short-term adaptation of mussels to temperature change at a molecular level, by analysing the expression patterns of 23 genes in response to heat shocks for either 30 or 120 min, at 25 and 30°C followed by a 48 h recovery period at 5°C (Boutet *et al.*, 2009). The physiological answer initially observed, was an induction of gene expression for most genes, about 2 h after the beginning of the shock, but in general the mussel response to increasing temperature was a depression in gene expression (Boutet *et al.*, 2009). In our case, the 1h heat-shock followed by a 2h recovery period seems to be an appropriate protocol. At this stage, it is hard to infer the reason why symbiont abundances changed upon a heat shock, but the most important result is that we notice that the change is of moderate amplitude. Neither bacterial nor host cells appear disrupted, indicating that the heat shock probably did not threaten the interaction, and thus that this symbiosis is relatively heat-resistant. This aspect could be adaptive, given that heat shocks can considerably alter other symbiotic interactions such as those within coastal corals and sponges (Webster *et al.*, 2008; Thurber *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2013).

Response to bicarbonate and sulphide under pressure

Experiments with increased concentrations of different substrates for symbionts metabolism or with mussels starvation have been already performed by various groups of researchers (Kádár *et al.*, 2005; Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008) but always on mussels from the shallowest hydrothermal vent systems (namely Menez Gwen) and at ambient pressure. Here, for the first time we could test effects on pressurized *B. azoricus* mussels from the deeper Rainbow site (2300m depth), which are not amenable to laboratory maintenance. Mussels recovered with decompression from Rainbow indeed die within couple of hours (personal observation). In our experiments, PERISCOP-recovered mussels were transferred to pressure vessels and maintained at 8°C at 230 bars. After only 5h of incubation in a mix of $NaHCO_3$ and Na_2S the relative volume of SOX in the gill bacteriocytes had doubled (from 42.5 % ± 7.6 to 90.0 % ± 18.2). When exposed to $NaHCO_3$ alone, SOX volume had also significantly increased to 76.0 % ± 23.0. (Figure 4, Table 6) This rapid change in the relative symbionts volume demonstrate that observations reported in Halary and co-authors' work (2008) on mussels from Menez Gwen hydrothermal were not artefactual, and the increase of SOX volume is here even more spectacular (65.0 % ± 8.6 in the previous study). In another study, mussels have been subjected to a one month H_2S starvation that caused the SOX volume to decrease, followed by 4 days of constant H_2S application, after which the observed SOX volume reached 96%. We here show that *B. azoricus* can shift to an almost thiotrophic mono-

symbiosis can occur much faster, within 5 hours. Thiotrophic symbionts fix the inorganic carbon by the enzymatic activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RubisCO) in Calvin cycle (Cavanaugh *et al.*, 1988). This process requires energy from the oxidation of reduced sulphur compounds (Cavanaugh *et al.*, 1988). The increase of the relative abundance of SOX symbionts when only the bicarbonate is available suggests another source of energy may be used for the chemosynthesis. Hydrogen has been proposed as an alternative energy source for hydrothermal vent symbioses (Petersen *et al.*, 2011) as it is a particularly favourable electron donor (Amend & Shock, 2001). Another possibility would be that in these conditions, the methanotrophs are digested by host bacteriocytes before thiotrophs as they are located more basally in the cells, resulting in increased relative abundance of SOX (Distel *et al.*, 1995; Duperron *et al.*, 2005).

3D FISH vs. 454 pyrosequencing quantification of symbionts

Generally, the respective percentages of SOX obtained by pyrosequencing are higher than those from 3D FISH (Table 8). This can be explained by their smaller size, compared to methanotrophs, and by consequence much smaller volume occupied by the same number of bacteria. Nevertheles, similar patterns between the respective values are observed for both methods. There is a single exception of heat-shock experiment, where the volume of SOX (2D FISH only) decreases after the heat-shock, while the number of sequences increases. In this case, bacteria seem to be ingested by the host or less resistant to high temperatures, but in both options they might counteract by activating their replication, thus the number of sequences could actually be increasing. Values obtained for both quantification methods correlate (R^2=0.69, Figure 5) suggesting that 454 pyrosequencing might be a potential tool for symbiont quantification faster and less time-consuming, although more expensive.

Conclusions

In this study we optimized the FISH-based method for quantification of relative abundances of endosymbionts in *Bathymodiolus azoricus* gills by simplifying the FISH protocol, which allowed us to analyse more individuals. Mussels' recovery mode during sampling did not significantly influence the relative volumes occupied by each symbiont phylotype, but no information is available on the physiological state of mussels and their endosymbionts. The proportions of the two symbionts have been shown to be stable over time by comparisons with values generated in earlier studies. For the first time, we could perform *in vivo* stress experiments on mussels under their native pressure. Heat-shock has triggered a small decrease

in the relative volume of SOX, while the incubation with sulphur compounds has doubled their volume in gill bacteriocytes within 5 hours. This suggests a very quick adaptation to the changes in physical-chemical conditions by optimization of endosymbiont populations. As postulated before, this is an advantage because physico-chemical micro-environments at hydrothermal vents are highly variable in time and space (Johnson *et al.*, 1986; Chevaldonné *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1994; Le Bris *et al.*, 2005), and this might be the key for the domination of *Bathymodiolus azoricus* at various sites in the Mid-Atlantic Ridge (Von Cosel *et al.*, 1999; Desbruyères *et al.*, 2000, 2001). Results obtained by 454 pyrosequencing seem to be congruent with those from FISH techniques, at least in terms of trends. Nevertheless more specimens are needed to fully validate this method of quantification. Symbiont release from animals exposed to chemical stress will be tested by checking if any symbiotic bacteria are present in the water at the end of experiment. The DNA from bacteria retained on filters has been extracted and is being sequenced. Tests involving different other types of stress for various durations should be investigated in the future. Backing this data with gene and protein expression for hosts and symbiont should reveal the mechanisms underlying the flexibility of the symbiotic system. All these improvements will be applied for further analyses of symbiotic metazoans from other cruises.

Acknowledgments

We thank captain Gilles Fernand, crew of RV *Pourquoi pas?*, chief scientist of BioBaz 2013 cruise François Lallier, and teams operating ROVs *Victor 6000* (Ifremer, France). This research was supported by UPMC and ITN Symbiomics. Kamil Szafranski was funded through a Ph.D. grant from the Marie Curie Actions Initial Training Network (ITN) SYMBIOMICS (contract number 264774)

References

Abramoff M, Magelhaes P, Ram S. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int* **11**:36–42.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389–3402.

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 Microbiol* **56**:1919–1925.

Amend JP, Shock EL. (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**:175–243.

Bachy C, Dolan JR, López-García P, Deschamps P, Moreira D. (2013). Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *ISME J* **7**:244–255.

Boutet I, Ripp R, Lecompte O, Dossat C, Corre E, Tanguy A, *et al.* (2011). Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* **12**:530.

Boutet I, Tanguy A, Le Guen D, Piccino P, Hourdez S, Legendre P, *et al.* (2009). Global depression in gene expression as a response to rapid thermal changes in vent mussels. *Proc Biol Sci* **276**:3071–3079.

Le Bris N, Duperron S. (2010). Chemosynthetic communities and biogeochemical energy pathways along the Mid-Atlantic Ridge: The case of *Bathymodiolus azoricus*. In:*Diversity Of Hydrothermal Systems On Slow Spreading Ocean Ridges*, Rona, PA, Devey, CW, Dyment, J, & Murton, BJ (eds), American Geophysical Union, pp. 409–429.

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

Cannuel R, Beninger PG, McCombie H, Boudry P. (2009). Gill Development and Its Functional and Evolutionary Implications in the Blue Mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *Biol Bull* **217**:173–188.

Cavanaugh CM. (1983). Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature* **302**:58–61.

Cavanaugh CM, Abbott MS, Veenhuis M. (1988). Immunochemical localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the symbiont-containing gills of *Solemya velum* (Bivalvia: Mollusca). *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:7786–7789.

Cavanaugh CM, Wirsen CO, Jannasch HW. (1992). Evidence for Methylotrophic Symbionts in a Hydrothermal Vent Mussel (Bivalvia: Mytilidae) from the Mid-Atlantic Ridge. *Appl Environ Microbiol* **58**:3799–3803.

Chevaldonné P, Desbruyères D, Haître ML. (1991). Time-series of temperature from three deep-sea hydrothermal vent sites. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **38**:1417–1430.

Childress JJ, Fisher CR, Brooks JM, Kennicutt MC, Bidigare R, Anderson AE. (1986). A methanotrophic marine molluscan (bivalvia, mytilidae) symbiosis: mussels fueled by gas. *Science* **233**:1306–1308.

Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, Herzen RP von, Ballard RD, *et al.* (1979). Submarine Thermal Sprirngs on the Galápagos Rift. *Science* **203**:1073–1083.

Von Cosel R, Cosel RV, Comtet T, Krylova EM. (1999). *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *Veliger* **42**:218–248.

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

Desbruyères D, Biscoito M, Caprais J-C, Colaço A, Comtet T, Crassous P, *et al.* (2001). Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **48**:1325–1346.

Distel DL, Lee HK, Cavanaugh CM. (1995). Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:9598–9602.

Van Dover C. (2000). The ecology of deep-sea hydrothermal vents. Princeton University Press: Princeton, N.J.

Van Dover CLV, German CR, Speer KG, Parson LM, Vrijenhoek RC. (2002). Evolution and Biogeography of Deep-Sea Vent and Seep Invertebrates. *Science* **295**:1253–1257.

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

Duperron S, Guezi H, Gaudron SM, Pop Ristova P, Wenzhöfer F, Boetius A. (2011). Relative abundances of methane- and sulphur-oxidising symbionts in the gills of a cold seep mussel and link to their potential energy sources. *Geobiology* **9**:481–491.

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

Duperron S, Nadalig T, Caprais JC, Sibuet M, Fiala-Medioni A, Amann R, *et al.* (2005). Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* sp. mussel from a methane seep on the gabon continental

margin (southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Appl Environ Microbiol* **71**:1694–1700.

Duperron S, 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.

Fan L, Liu M, Simister R, Webster NS, Thomas T. (2013). Marine microbial symbiosis heats up: the phylogenetic and functional response of a sponge holobiont to thermal stress. *ISME J* **7**:991–1002.

Fiala-Medioni A, McKiness ZP, Dando P, Boulegue J, Mariotti A, Alayse-Danet AM, *et al.* (2002). Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Mar Biol* **141**:1035–1043.

Fisher CR, Brooks JM, Vodenichar JS, Zande JM, Childress JJ, Jr. RAB. (1993). The Co-occurrence of Methanotrophic and Chemoautotrophic Sulfur-Oxidizing Bacterial Symbionts in a Deep-Sea Mussel. *Mar Ecol* **14**:277–289.

Halary S, Riou V, Gaill F, Boudier T, Duperron S. (2008). 3D FISH for the quantification of methane- and sulphur-oxidizing endosymbionts in bacteriocytes of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *ISME J* **2**:284–292.

Johnson KS, Beehler CL, Sakamoto-Arnold CM, Childress JJ. (1986). *In Situ* Measurements of Chemical Distributions in a Deep-Sea Hydrothermal Vent Field. *Science* **231**:1139–1141.

Johnson KS, Childress JJ, Beehler CL, Sakamoto CM. (1994). Biogeochemistry of hydrothermal vent mussel communities: the deep-sea analogue to the intertidal zone. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **41**:993–1011.

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

Karl DM, Wirsen CO, Jannasch HW. (1980). Deep-Sea Primary Production at the Galapagos Hydrothermal Vents. *Science* **207**:1345–1347.

Lorion J, Halary S, Nascimento J do, Samadi S, Couloux A, Duperron S. (2012). Evolutionary history of *Idas* sp. Med (Bivalvia: Mytilidae), a cold seep mussel bearing multiple symbionts. *Cah Biol Mar* **53**:77–87.

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

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, *et al.* (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**:D590–596.

Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ. (2011). Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *BMC Bioinformatics* **12**:38.

R Development Core Team. (2013). R Development Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org.

Ravaux J, Hamel G, Zbinden M, Tasiemski AA, Boutet I, Léger N, *et al.* (2013). Thermal Limit for Metazoan Life in Question: *In Vivo* Heat Tolerance of the Pompeii Worm. *PLoS ONE* **8**:e64074.

Riou V, Duperron S, Halary S, Dehairs F, Bouillon S, Martins I, *et al.* (2010). Variation in physiological indicators in *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae) at the Menez Gwen Mid-Atlantic Ridge deep-sea hydrothermal vent site within a year. *Mar Environ Res* **70**:264–271.

Riou V, Halary S, Duperron S, Bouillon S, Elskens M, Bettencourt R, *et al.* (2008). Influence of CH4 and H2S availability on symbiont distribution, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences* **5**:1681–1691.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, *et al.* (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **75**:7537–7541.

Shillito B, Gaill F, Ravaux J. (2014). The IPOCAMP Pressure Incubator for Deep-Sea Fauna. *J Mar Sci Technol-Taiwan* **22**:97–102.

Shillito B, Hamel G, Duchi C, Cottin D, Sarrazin J, Sarradin P-M, *et al.* (2008). Live capture of megafauna from 2300 m depth, using a newly designed Pressurized Recovery Device. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **55**:881–889.

Thurber RV, Willner-Hall D, Rodriguez-Mueller B, Desnues C, Edwards RA, Angly F, *et al.* (2009). Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ Microbiol* **11**:2148–2163.

Trask JL, Van Dover CL. (1999). Site-specific and ontogenetic variations in nutrition of mussels (*Bathymodiolus* sp.) from the Lucky Strike hydrothermal vent field, Mid-Atlantic Ridge. *Limnol Oceanogr* **44**:334–343.

Wallner G, Amann R, Beisker W. (1993). Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**:136–143.

Webster NS, Cobb RE, Negri AP. (2008). Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *ISME J* **2**:830–842.

Figures

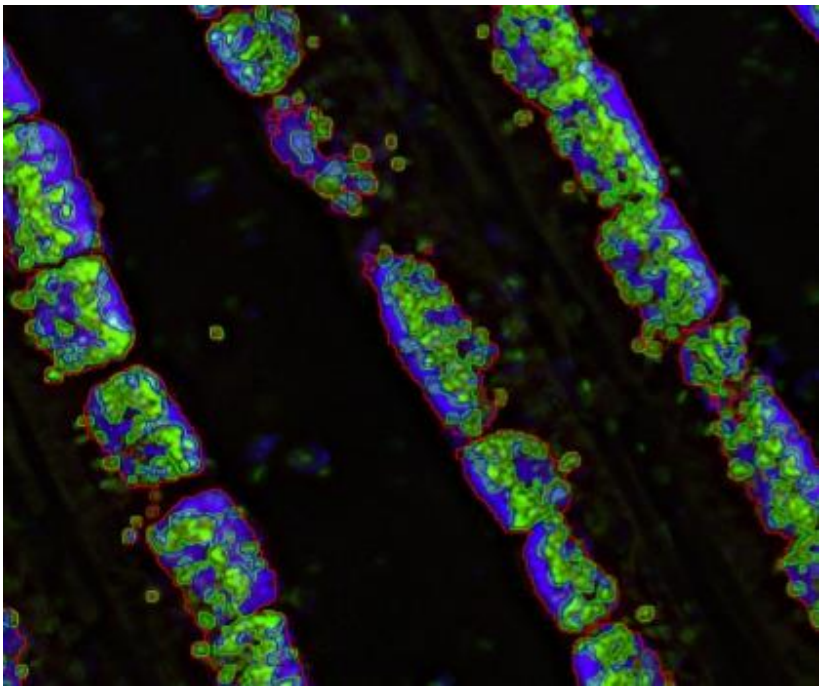


Figure 7-1: Figure 1: Fluorescence *in situ* hybridization of symbiotic bacteria on transverse section of gill filament from *Bathymodiolus azoricus* mussel. Sulfur-oxidizers appear in blue, methanotrophs in green, the area of all bacteria is enclosed by red line.

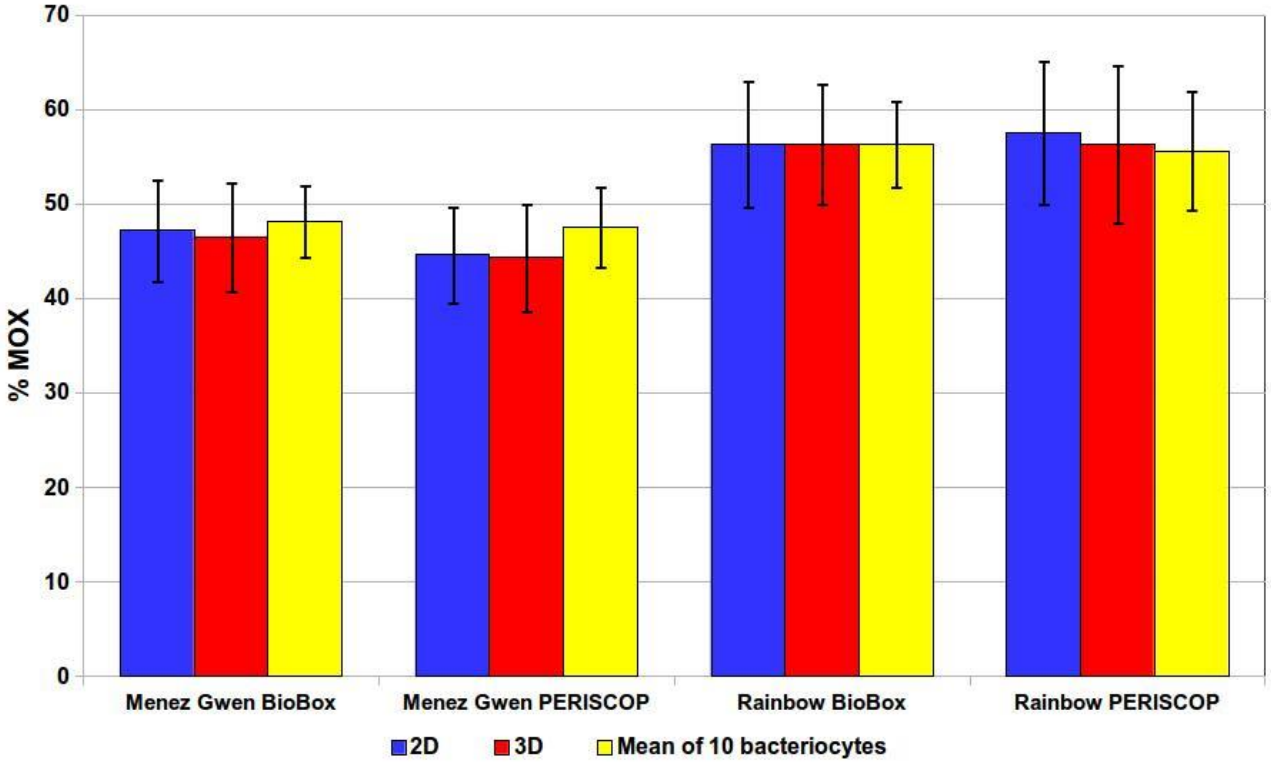


Figure 7-2: Figure 2: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs in bacteriocytes of gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels, recovered in BioBoxes and PERISCOP from Menez Gwen and Rainbow sites. Values were measured with 2D and 3D FISH techniques and with 3D image of 10 randomly extracted bacteriocytes.

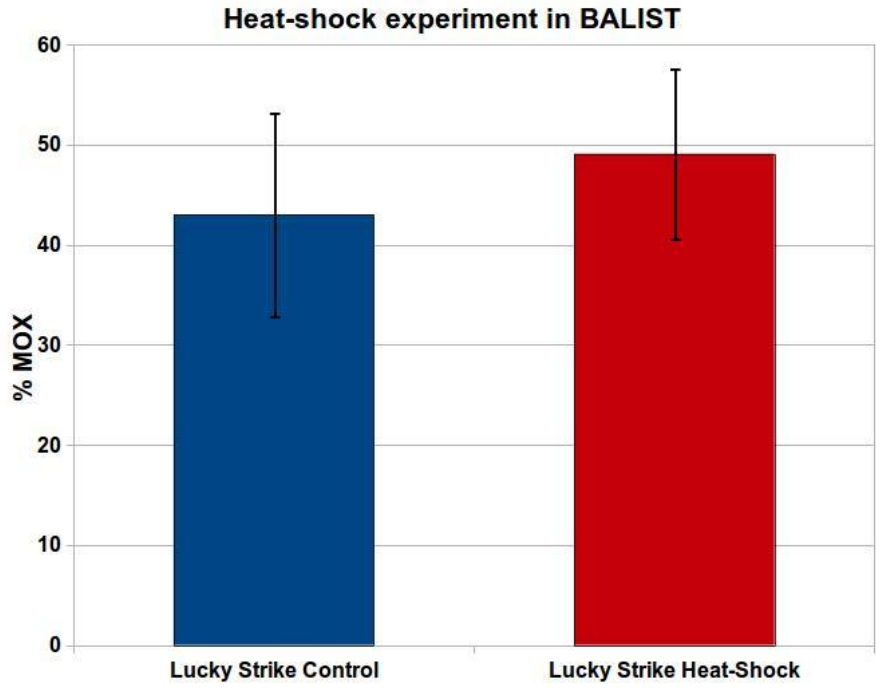


Figure 7-3: Figure 3: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs in bacteriocytes of gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels, recovered in PERISCOP from Lucky Strike site. Values were measured with 2D FISH after the heat-shock experiment.

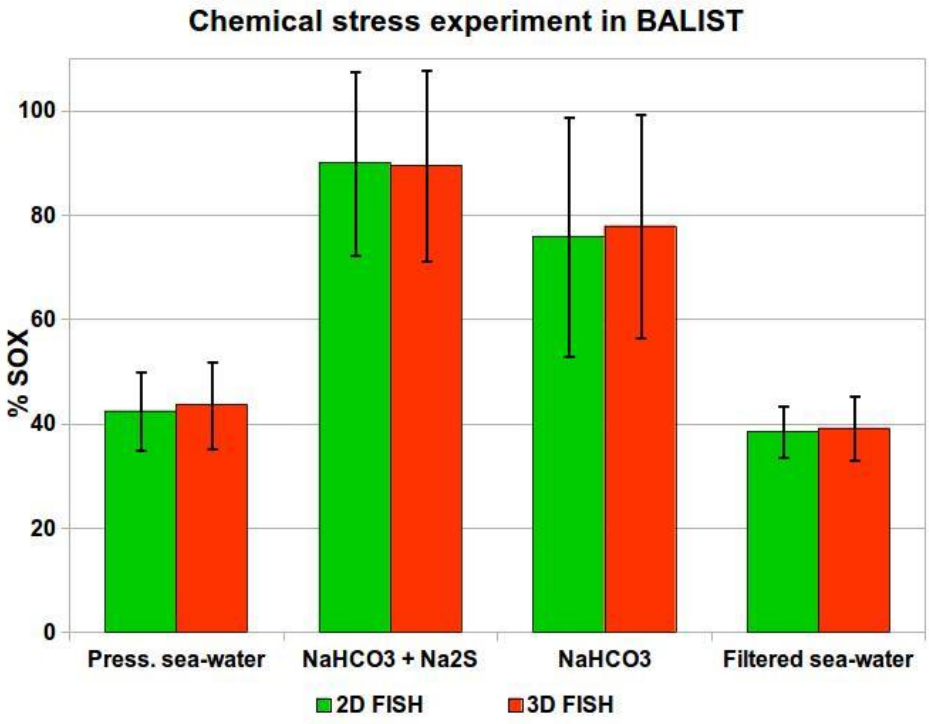


Figure 7-4: Figure 4: The mean percentage of the volume occupied by thiotrophs in bacteriocytes of gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels, recovered in PERISCOP from Rainbow sites. Values were measured with 2D and 3D FISH techniques after chemical stress experiments.

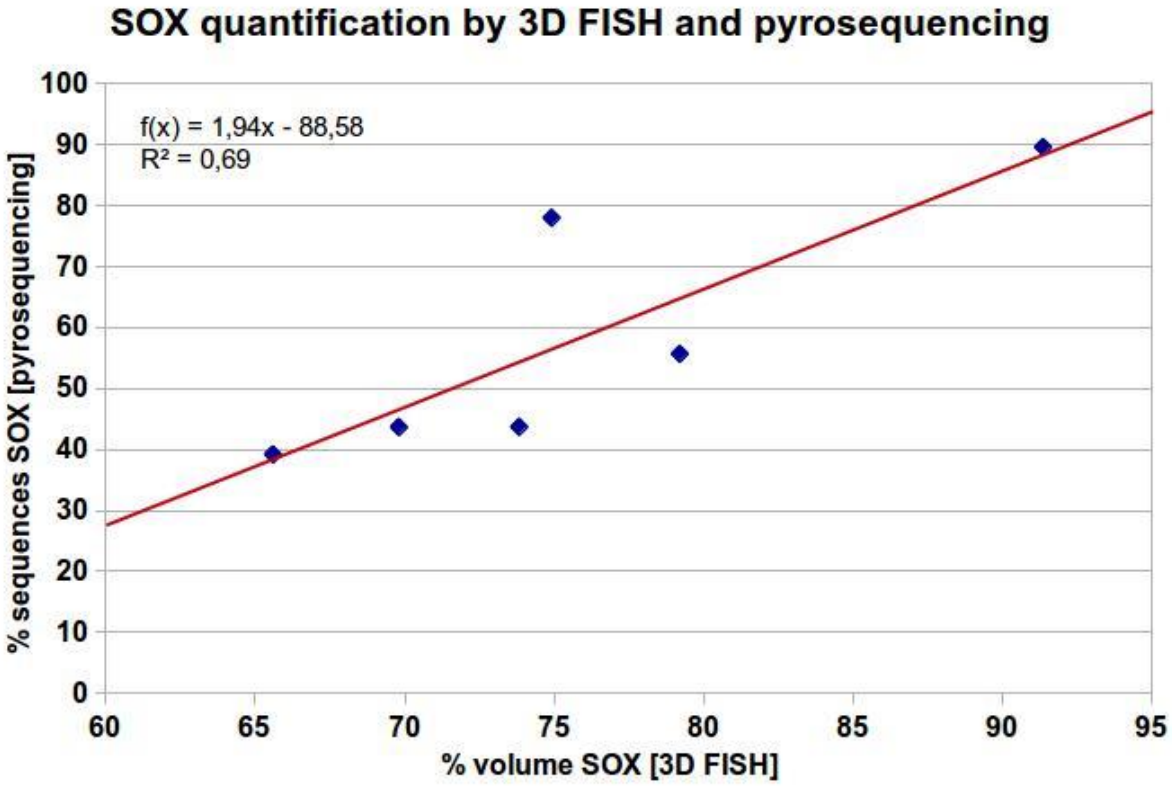


Figure 7-5: Figure 5: The comparison of the respective values obtained with two methods of bacterial quantification (3D FISH and 454 pyrosequencing). The regression line was calculated (f(x)=1.94x-88.58) with R^2=0.69

Tables

Site	Point	Depth	Position	Recovery mode	Number of samples analysed	Chemical stress	Heat-shock
Menez Gwen	MG2	830 m	37°50.669 N	BioBox	7	0	0
			31°31.156 W	PERISCOP	10	0	0
Lucky Strike	Tour Eiffel	1690 m	37°17.349 N	BioBox	0	0	0
			32°16.536 W	PERISCOP	14	0	14
Rainbow	France 5	2270 m	36°13.766 N	BioBox	3	0	0
			33°54.117 W	PERISCOP	16	16	0
Mid-Atlantic Ridge				Total	50	16	14

Tableau 7-1: Table 1: Details on sampling sites (depth and geographical position), recovery mode and number of specimens analysed in all experiments.

Probe	Target	Sequence [5' → 3']	Cy3	Cy5	FITC	Channel colour	Reference
EUB_338	Eubacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	+	+	+	red	Amann *et al.*, 1990
Imed_M-138	methanotrops	ACCATGTTGTCCCCCACTAA	+	-	-	green	Duperron *et al.*, 2008
Bang_T-642	thiotrophs	CCTATACTCTAGCTTGCCAG	-	+	-	blue	Duperron *et al.*, 2005
NON_338	negative control	ACTCCTACGGGAGGCAGC	+	+	-	-	Wallner *et al.*, 1993

Tableau 7-2: Table 2: Details on probes used in FISH experiments (sequence and fluorochrome attached) and their respective false colors on images acquired on epifluorescence microscope.

Site	Recovery mode	Number of samples	Value	2D FISH		3D FISH		10 bacteriocytes	
				% MOX	% SOX	% MOX	% SOX	% MOX	% SOX
Menez Gwen	BioBox	7	Mean	47.2	52.8	46.5	53.5	48.1	51.9
			S.D	5.4		5.8		3.8	
	PERISCOP	10	Mean	44.6	55.4	44.3	55.7	47.5	52.5
			S.D	5.1		5.7		4.2	
Rainbow	BioBox	3	Mean	56.3	43.7	56.3	43.7	56.3	43.7
			S.D	6.6		6.4		4.6	
	PERISCOP	10	Mean	57.5	42.5	56.3	43.7	55.6	44.4
			S.D	7.6		8.3		6.3	
Anterior zone of gill tissue									

Tableau 7-3: Table 3: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs (MOX) and sulfur-oxidizers (SOX) in bacteriocytes of the anterior gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels recovered in BioBoxes and PERISCOP from Menez Gwen and Rainbow sites. Values were measured with 2D and 3D FISH techniques and with 3D image of 10 randomly extracted bacteriocytes.

Site	Recovery mode	Number of samples	Value	2D FISH		3D FISH	
				% MOX	% SOX	% MOX	% SOX
Menez Gwen	BioBox	3	Mean	47.4	52.6	47.1	52.9
			S.D	4.9		6.2	
	PERISCOP	3	Mean	43.0	57.0	42.0	58.0
			S.D	5.5		6.3	
Rainbow	BioBox	3	Mean	55.5	44.5	55.1	44.9
			S.D	7.0		6.0	
	PERISCOP	3	Mean	61.1	38.9	58.7	41.3
			S.D	5.8		7.5	
Posterior zone of gill tissue							

Tableau 7-4: Table 4: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs (MOX) and sulfur-oxidizers (SOX) in bacteriocytes of the posterior gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels recovered in BioBoxes and PERISCOP from Menez Gwen and Rainbow sites. Values were measured with 2D and 3D FISH techniques.

Anova permutation test								
Variance type	**Terms**	**Degrees of freedom**	**Variance**	**F**	**Nb of permutations**	**Pr**	**Proportion %**	
Constrained	factor(SITE)	1	0,4093	1026	99	0	40,93	55,8
	factor(REC)	1	0,0031	7,7	99	0	0,306	
	factor(METH)	2	0,0031	3,8	99	0	0,306	
	factor(GILL)	1	4E-05	0,1	99	0,8	0,004	
	factor(IND)	27	0,1429	13,3	99	0	14,29	
Unconstrained	Residual	1107	0,4416				44,2	44,2
Total			1,00				100,0	100,0
Model: rda(formula = spe ~ factor(SITE) + factor(REC) + factor(METH) + factor(GILL) + factor(IND), data = env, scale = TRUE)								
Permutation test for rda under full model								
Terms added sequentially (first to last)								

Tableau 7-5: Table 5: Statistical estimation of the influence of various factors on the relative abundances of symbionts in all samples analysed, and their respective significance in redundancy analysis (RDA), assessed using ANOVA permutation tests in R (R Development Core Team, 2013). Factors: SITE – site; REC – recovery type; METH – acquisition method; GILL – gill region; IND – specimen.

Site	**Recovery mode**	**Sample**	**Number of samples**	**Value**	**2D FISH**		**3D FISH**	
					% MOX	**% SOX**	**% MOX**	**% SOX**
Lucky Strike	PERISCOP	Control	5	Mean	43.0	57.0	-	-
				S.D	10.2		-	
		Heat-Shock	9	Mean	49.1	50.9	-	-
				S.D	8.5		-	
Rainbow		Sea-water before experiment	10	Mean	57.5	42.5	56.3	43.7
				S.D	7.6		8.3	
		$NaHCO_3$ + Na_2S	2	Mean	9.9	90.1	10.4	89.6
				S.D	17.6		18.2	
		NaHCO3	2	Mean	24.0	76.0	22.0	78.0
				S.D	23.0		21.4	
		Filtered sea-water	2	Mean	61.5	38.5	60.8	39.2
				S.D	4.9		6.1	
Anterior gill tissue								

Tableau 7-6: Table 6: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs (MOX) and sulfur-oxidizers (SOX) in bacteriocytes of the anterior gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels recovered in PERISCOP and subjected to the heat-shock experiment (mussels from Lucky Srtike) and chemical stress experiment (mussels from Rainbow). Values were measured with 2D and 3D FISH techniques (chemical stress) or with 2D FISH only (heat-shock).

Anova permutation test								
Variance type	**Terms**	**Degrees of freedom**	**Variance**	**F**	**Nb of permutations**	**Pr**	**Proportion %**	
Constrained	factor(TREAT)	3	0,68564	506,7	99	0	68,56	86,33
	factor(METH)	1	0,00041	0,9	99	0,60	0,04	
	factor(IND)	12	0,17729	32,8	99	0	17,73	
Unconstrained	Residual	303	0,13667				13,67	13,67
Total			1,00				100	100
Model: rda(formula = spe ~ factor(TREAT) + factor(METH) + factor(IND), data = env, scale = TRUE)								
Permutation test for rda under full model								
Terms added sequentially (first to last)								

Tableau 7-7: Table 7: Statistical estimation of the influence of various factors on the relative abundances of symbionts exposed to chemical stress, and their respective significance in redundancy analysis (RDA), assessed using ANOVA permutation tests in R (R Development Core Team, 2013). Factors: TREAT – chemical treatment; METH – acquisition method; IND – specimen.

OTU	Repr.sequence	Menez Gwen PERISCOP	Rainbow PERISCOP	Rainbow BioBox	Rainbow $NaHCO_3$ + Na_2S	Rainbow $NaHCO_3$	Rainbow Filtered sea-water	Control heat-shock	Heat-shock	Total	Type
OTU_00001	K24_1_0_2583	1294	1009	979	2046	1842	1430	1568	2583	12751	**SOX**
OTU_00003	K21_1_2_476	270	396	255	163	489	682	476	408	3139	**MOX**
OTU_00005	K20_1_4_153	72	109	58	15	69	209	60	120	712	**SOX**
OTU_00006	K20_1_6_174	88	79	94	0	43	174	42	23	543	**MOX**
OTU_00017	K10_1_13_123	0	0	0	1	0	0	245	3	249	**Epsilon**
OTU_00015	K24_1_7_27	0	0	0	0	0	0	16	27	43	**Other**
OTU_00018	K13_1_2_23	0	0	0	0	0	0	20	0	20	**Epsilon**
OTU_00022	K19_1_5_29	0	1	11	17	29	0	0	0	58	**Epsilon**
OTU_00020	K12_1_7_7	0	0	0	0	0	0	2	7	9	**Epsilon**
OTU_00027	K19_1_8_49	0	1	0	0	49	8	1	0	59	**Other**
OTU_00023	K19_1_10_26	0	7	0	0	26	1	0	0	34	**Other**
OTU_00062	K10_1_2_17	0	0	0	0	0	0	8	0	8	**SOX**
OTU_00106	K20_1_5_14	0	1	1	8	0	14	0	0	24	**SOX**
OTU_00038	K10_1_9_7	0	0	0	0	0	0	7	0	7	**Epsilon**
OTU_00084	K18_1_15_11	0	0	0	11	0	0	0	3	14	**Epsilon**
OTU_00112	K19_1_11_3	0	0	3	2	3	0	0	0	8	**Epsilon**
OTU_00113	K16_1_15_5	0	0	5	0	0	0	0	0	5	**Other**
Number of sequences	**Total**	1724	1603	1406	2263	2550	2518	2445	3174	17683	**All**
	Total SOX	1366	1119	1038	2069	1911	1653	1636	2703	13495	**SOX**
	Total MOX	358	475	349	163	532	856	518	431	3682	**MOX**
	Total others	0	9	19	31	107	9	291	40	506	**Other**
% of sequences	**% SOX**	79,2	69,8	73,8	91,4	74,9	65,6	66,9	85,2	76,3	**SOX**
	% MOX	20,8	29,6	24,8	7,2	20,9	34,0	21,2	13,6	20,8	**MOX**
	% other	0,0	0,6	1,4	1,4	4,2	0,4	11,9	1,3	2,9	**Other**
2D FISH	**% volume SOX**	55,4	42,5	43,7	90,1	76	38,5	57	50,9		**SOX**
	% volume MOX	44,6	57,5	56,3	9,9	24	61,5	43	49,1		**MOX**
3D FISH	**% volume SOX**	55,7	43,7	43,7	89,6	78	39,2				**SOX**
	% volume MOX	44,3	56,3	56,3	10,4	22	60,8				**MOX**

Tableau 7-8: Table 8: The total number of V5-V6 sequences in OTUs, represented by more than 5 sequences in the dataset. OTUs were assigned to different bacterial phylotypes by Blast on SILVA 115 database with OTU identity threshold at 97%. The relative percentage of SOX, MOX and other bacterial sequences was normalized by the total number of sequences per sample.

8. Discussion générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude des symbioses entre les bactéries et les bivalves des habitats à base chimiosynthétique de l'océan profond. Cette thèse se focalise sur l'interaction particulière entre les bactéries et les bivalves, et les symbioses y sont analysées à travers les cycles de vie des bactéries symbiotiques et de leurs hôtes. Cet angle-là a permis de développer trois volets d'analyse et de répondre à plusieurs questions scientifiques formulées au chapitre 4. Les différents types d'habitats, les exemples d'associations symbiotiques dans ces écosystèmes, ainsi que les scénarios possibles concernant les cycles de vie des symbiontes ont été présentés dans l'introduction de ce manuscrit. Les différentes étapes du cycle de vie des symbiontes : dans l'environnement lors de la transmission horizontale, dans les gamètes et les stades juvéniles précoces pendant la transmission verticale, mais aussi la dynamique de l'association au sein des hôtes sont l'objet des trois chapitres précédents. Même si chacun d'entre eux constitue un travail indépendant, basé sur un modèle différent, ils participent tous à la compréhension de ce qui se passe avec les symbiontes bactériens dans et en dehors de leurs hôtes. Les conclusions issues de chaque chapitre permettent de remplir quelques « cases vides » dans notre connaissance des symbioses dans les milieux marins profonds. Dans la discussion générale de ma thèse, ces arguments sont discutés et intégrés pour en tirer une image des avancées réalisées. Il faut bien sûr convenir d'entrée qu'il reste toujours d'autres « cases » à remplir, car les méthodes que l'on emploie, ne sont jamais parfaites et que dans le cas de l'océan profond, on est limité par le nombre d'échantillons obtenus ou par la technologie employée.

8.1 La place des formes libres des symbiontes dans l'environnement

Dans le premier volet de mon travail, la place des formes libres de symbiontes dans les communautés microbiennes a été analysée. Puisque certains métazoaires colonisant les habitats à base chimiosynthétique dans l'océan profond, comme les sources hydrothermales, les suintements froids et les débris organiques, vivent en symbioses avec les bactéries sulfo-oxydantes et méthanotrophes et qu'une partie importante de ces symbioses sont transmises entre les générations successives de leurs hôtes par l'environnement, l'existence de formes libres est attendue (Gros *et al.*, 1996; McFall-Ngai, 2000; Won *et al.*, 2003; Nussbaumer *et al.*, 2006; Dubilier *et al.*, 2008; Duperron *et al.*, 2008a; Bright and Bulgheresi, 2010; Vrijenhoek, 2010). Même en cas de transfert latéral chez les groupes de métazoaires à

transmission *a priori* verticale des symbiontes, des formes libres peuvent transitoirement apparaître dans l'environnement (Stewart *et al.*, 2008; Stewart and Cavanaugh, 2009; Decker *et al.*, 2013). Peu d'études concernent les communautés bactériennes associées aux bois coulés (Palacios *et al.*, 2009; Fagervold *et al.*, 2012, 2013, 2014; Bienhold *et al.*, 2013). Encore moins de travaux documentent l'existence de formes libres des symbiontes dans les zones côtières (Lee and Ruby, 1992; Gros *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2008) et dans les milieux profonds (Harmer *et al.*, 2008). Dans l'article scientifique 1, la composition des communautés microbiennes qui avaient colonisé les deux types de substrats (bois et luzerne) déployés dans l'Atlantique et dans la Méditerranée, issus des modules de colonisation standardisés CHEMECOLI (Gaudron *et al.*, 2010), est analysée en réplicats à l'aide du séquençage à haut débit (Margulies *et al.*, 2005; Sogin *et al.*, 2006; Huber *et al.*, 2007). Au total, 53 échantillons provenant de 8 sites différents localisés à proximité de sources hydrothermales et de suintements froids ont été traités, un nombre d'échantillons et de conditions jamais traités auparavant en matière de colonisation de substrats organiques. L'attention portée au protocole de traitement des séquences, éliminant les erreurs dues au pyroséquençage (Huse *et al.*, 2007, 2010; Quince *et al.*, 2009, 2011; Schloss *et al.*, 2009, 2011; Kunin *et al.*, 2010; Caporaso *et al.*, 2010) utilisé dans cet étude a été validée auparavant (Bachy *et al.*, 2013). Au sein des communautés bactériennes découvertes dans cette analyse, on distingue des spécialistes impliqués dans la dégradation des biopolymères comme la cellulose (Kirchman, 2002), des taxons bactériens similaires à ceux identifiés dans les études précédentes (Fagervold *et al.*, 2012, 2013; Bienhold *et al.*, 2013) et des formes libres de bactéries symbiotiques, ou leurs proches parents. Ces dernières sont particulièrement intéressantes pour nous. Elles ont été identifiées par la comparaison des séquences avec la base publique de données, mais pour mieux gérer les risques d'identification de faux positifs, une deuxième évaluation, par analyse phylogénétique, a été faite. Au final, plus de 21 000 séquences regroupées en 17 OTU phylogénétiquement proches de symbiontes ont été ainsi confirmées. 70 % d'entre elles ont été identifiées à la surface des cubes de pin et 30 % provenaient de la paille de luzerne. Ce déséquilibre entre les deux substrats peut potentiellement être dû à l'effet de « dilution » puisque la diversité bactérienne est plus importante sur l'herbe de luzerne, un substrat plus facile à dégrader et à coloniser. Dans l'ensemble, ces travaux ont permis d'évaluer à quelques pour cents la proportion de bactéries apparentées aux symbiontes, présentes dans l'environnement et attirées par les surfaces à coloniser. La pertinence des modules de colonisation repose sur le fait que les symbiontes, pour « conquérir » les tissus de leurs hôtes doivent s'attacher à leur surface (Nussbaumer *et al.*, 2006; Adin *et al.*, 2008) avant de

commencer les négociations pour pouvoir s'y installer, si bien qu'il est logique de les trouver parmi la « microflore » pionnière. Chez les métazoaires, une telle colonisation, ou recolonisation a lieu périodiquement chez les crevettes *Rimicaris exoculata*. Après chaque cycle de mue, qui dure 10 jours environ, les Epsilonproteobacteria recolonisent la chambre branchiale (Zbinden *et al.*, 2004; Corbari *et al.*, 2008). Ce fait est clairement visible dans nos résultats, les séquences des OTUs liées à des symbiontes d'Alvinocarididae étant les plus nombreuses sur la dorsale médio-atlantique, habitat des crevettes *R. exoculata*, dans les modules de colonisation à court terme. Il est remarquable qu'aucune bactérie apparentée à un symbionte à transmission verticale n'ait été détectée.

Les études précédentes permettaient juste la détection et l'identification des bactéries symbiotiques par PCR et FISH (Gros *et al.*, 2003; Harmer *et al.*, 2008), contrairement aux présents travaux où elles sont quantifiées, au moins dans une certaine mesure. Même si les valeurs absolues ne peuvent pas être obtenues, l'ordre de grandeur général se place autour de 4 % de séquences apparentées aux symbiontes dans l'ensemble du jeu de données. Pour quantifier les formes libres de symbiontes, une méthodologie similaire à celle de l'article scientifique 3 aurait pu être employée, mais malgré des essais, la technique de FISH n'a finalement pas été utilisée parce que dans ce cas, elle semble être moins précise que le pyroséquençage. Sachant que les symbiontes sont phylogénétiquement proches des bactéries chimiosynthétiques libres (Dubilier *et al.*, 2008) et vue la diversité microbienne dans les sites analysés, la longueur de seulement 20 pb de la région cible d'une sonde fluorescente spécifique, à trouver sur 300 pb dans le cas de la région variable V5-V6 de l'ARNr 16S analysée par 454, ne semble pas assurer une résolution suffisante. Le risque de compter ainsi des faux positifs est élevé. Qui plus est, la nature des substrats utilisés est à l'origine d'un bruit de fond élevé (autofluorescence importante des tissus végétaux) lors des observations au microscope à fluorescence. Même si le pyroséquençage, faisant intervenir une PCR, n'est pas strictement quantitatif, la représentativité est partiellement validée *a posteriori* dans l'article scientifique 3, où le coefficient de corrélation entre les deux méthodes de quantification des symbiontes (FISH et pyroséquençage 454) dans les branchies de *Bathymodiolus azoricus* est élevé. La réplication d'échantillons renforce encore notre analyse, car dans la majorité des cas, les deux répétitions biologiques sont groupées ensemble sur toutes les représentations graphiques (NMDS, RDA, UPGMA). Enfin, la fixation et la conservation des substrats, stockés dans l'éthanol ou congelés, n'influencent pas l'issue des analyses moléculaires. Nous pouvons donc être confiants sur la qualité des échantillons utilisés, principalement stockés

dans l'éthanol pour des raisons pratiques liées au transport d'échantillons congelés après les campagnes océanographiques.

Après l'analyse de ces données, on peut être confiant de l'existence des formes libres de symbiontes ou de leurs formes apparentées dans l'environnement. Il semble que ces bactéries forment une proportion faible, mais pas négligeable, des communautés bactériennes sur les modules de colonisation. On peut aussi essayer de répondre, au moins partiellement et dans la limite des méthodes utilisées, à certaines de nos questions initiales : Où se trouvent les symbiontes dans l'environnement en cas de transmission horizontale? Ils peuvent à une étape de leur cycle de vie coloniser les surfaces et/ou les biofilms, où les substrats de leur métabolisme sont présents, un comportement typique des bactéries libres. Quelle est leur abondance réelle dans l'environnement? On peut l'estimer à quelques pour-cents de la communauté entière sur la surface des différents substrats. Est-ce que ces bactéries identifiées sont réellement des formes libres de symbiontes présents chez les animaux? Avec une forte probabilité oui, car celles que l'on a identifiées leurs sont phylogénétiquement très proches, même si ce point mériterait d'être approfondi.

8.2 Les preuves de la transmission verticale des symbiontes de Vesicomyidae

Dans le cas de la transmission verticale, les bactéries passent entre deux générations d'hôtes par l'intermédiaire des gamètes, l'association symbiotique est donc perpétuellement innée et héritée. Ce mode de transfert des symbiontes a été suggéré il y a 20 ans pour la famille des Vesicomyidae (Endow and Ohta, 1990; Cary and Giovannoni, 1993). Depuis, grâce à l'augmentation de la sensibilité des techniques moléculaires, et notamment du pyroséquençage et du FISH, des exemples de transmission mixte ont été démontrés au sein de cette famille de bivalves (Stewart *et al.*, 2008; Stewart and Cavanaugh, 2009; Decker *et al.*, 2013). Malgré une co-spéciation de l'hôte et du symbionte visible sur les arbres phylogénétiques (Peek *et al.*, 1998b), et une réduction importante de la taille du génome de ce dernier (Kuwahara *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2007), suggérant la transmission principalement verticale, il manquait une preuve directe en faveur de cette hypothèse. Les études précédentes étaient basées sur la détection des bactéries symbiotiques dans les gamètes à l'aide de la microscopie électronique à transmission (MET) (Endow and Ohta, 1990) ou par hybridation *in situ* (ISH) (Cary and Giovannoni, 1993). La première ne permettait pas

d'identifier les cellules bactériennes observées au niveau moléculaire, l'autre ne les localisait pas précisément dans les gamètes. Lors de cette thèse, le mode de transmission d'*Isorropodon bigoti*, un petit Vesicomyidae, a été analysé en détail. La reproduction d'*I. bigoti* semble être continue puisque les gamètes ont été identifiés à différents stades de développement. A l'aide du FISH et du CARD-FISH, l'occurrence des symbiontes dans les gonades, au voisinage direct des gamètes femelles, ainsi qu'à tous les stades d'ovogenèse, a été observée au microscope confocal. Leur localisation intracellulaire a été confirmée par MET. Si on avait plus de spécimens à analyser, avec cette méthodologie on pourrait même compter les symbiontes qui sont transmis dans un ovocyte unique. Néanmoins, il est clair qu'avec l'augmentation du volume des ovocytes au cours de l'ovogenèse, les bactéries deviennent de plus en plus rares à observer, ce qui suggère l'arrêt des divisions bactériennes dans les gamètes. Les symbiontes sont absents des spermatozoïdes, malgré les signaux faux-positifs détectés. Chez les femelles adultes, les bactéries ne sont présentes que dans les branchies et les ovocytes. Dans les stades post-larvaires de 200 µm de longueur, elles ont été observées en faible quantité dans les ébauches des branchies. Ces éléments complètent le cycle de vie de l'animal et des bactéries, néanmoins en raison du petit nombre de spécimens adultes et de post-larves, la translocation des symbiontes à travers les tissus de l'hôte n'a pas pu être montrée comme elle avait pu l'être chez *Riftia pachyptila* (Nussbaumer *et al.*, 2006). Dans le cas des stades post-larvaires d'*Isorropodon*, il n'est pas exclu que les symbiontes se développent dans les branchies et déjà dans les gonades en développement, surtout que les deux tissus sont des épithéliums, leur infection à un stade précoce étant par exemple connue chez les juvéniles de *Bathymodiolus puteoserpentis* (Wentrup *et al.*, 2013). Nos résultats n'excluent pas la possibilité d'une transmission occasionnelle par l'environnement, comme suggérée chez d'autres Vesicomyidae du golfe de Guinée (Decker *et al.*, 2013). La transmission mixte nécessiterait l'existence de formes libres des symbiontes de cette famille, tandis qu'aucun symbionte de Vesicomyidae n'a été détecté dans les colonisateurs CHEMECOLI des autres régions analysées et malgré la présence des clams de cette famille dans ces environnements. Decker et collaborateurs (2013) suggèrent que ce genre de transfert pourrait n'advenir que lorsque les hôtes sont physiquement proches, impliquant un temps de résidence dans l'environnement très court, peut-être indétectable. En parallèle, deux autres espèces, *Thyasira* sp. et *Idas modiolaeformis*, ont été testées pour la présence de symbiontes dans leurs gonades. Ils y étaient absents, ce qui confirme les résultats sur *I. modiolaeformis* de l'étude précédente (Gaudron *et al.*, 2012) et suggère la transmission environnementale chez les Thyasiridae.

Pour répondre aux questions posées précédemment, cette partie de la thèse a fourni une preuve directe de la transmission verticale des symbiontes chez les Vesicomyidae, les bactéries se trouvant dans les ovocytes à tous les stades d'ovogenèse et colonisant très tôt les tissus cibles (branchie en particulier) de la nouvelle génération de l'hôte.

8.3 La dynamique des populations de symbiontes en réponse aux stress abiotiques

L'équilibre de l'association symbiotique est assuré entre autres par la dynamique de la communauté bactérienne en symbiose avec l'hôte. En cas de conditions favorables, l'animal pour augmenter les profits tirés de la symbiose, peut acquérir de nouvelles bactéries ou leur permettre de se multiplier. Dans le cas contraire, pour s'en débarrasser, il peut les digérer ou potentiellement les évacuer dans l'environnement. Les variations de l'abondance de deux phylotypes bactériens en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'environnement ont déjà été mises en évidence chez *Bathymodiolus azoricus* (Kádár *et al.*, 2005; Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008, 2010). L'originalité de l'étude présentée ici, est d'avoir analysé cette dynamique chez des individus échantillonnés cette fois-ci, dans des conditions moins stressantes pour les organismes, à l'aide d'outils de remontée isobare, et après exposition à divers substrats dans des aquariums pressurisés. Par ailleurs, un volet méthodologique visant à optimiser le protocole de quantification des symbiontes a été développé. Premièrement, différentes méthodologies sont comparées pour choisir la méthode d'acquisition des images avec le souci d'améliorer le rapport qualité-temps de main d'œuvre. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les données issues des images acquises en 3D, en 2D et par analyse des bactériocytes un par un. Par cette approche, nous avons pu analyser 36 spécimens, tandis que les études précédentes s'appuyaient sur moins de 20 individus (Duperron *et al.*, 2007, 2011; Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008, 2010; Lorion *et al.*, 2012). Les valeurs obtenues pour le pourcentage de volume total occupé par chaque type de bactéries sont par ailleurs corrélées aux pourcentages de leurs séquences d'ARNr 16S mesurés par pyroséquençage, selon le même protocole que celui utilisé pour l'analyse en pyroséquençage des communautés associées aux CHEMECOLIs. L'approche basée sur le FISH et celle basée sur l'analyse par pyroséquençage donnent les mêmes tendances, et pourraient donc toutes deux être pertinentes pour quantifier les bactéries symbiotiques dans les tissus. Des essais de quantification par qPCR ont également été réalisés en parallèle, mais les résultats sont encore trop préliminaires pour être discutés.

Toutes les études de quantification relative ou absolue des symbiontes effectuées jusque maintenant, ont été faites sur des moules qui avaient subi une décompression lors de la remontée, avec toutes les conséquences physiologiques impossibles à estimer. Ici, grâce au système d'aquariums pressurisés PERISCOP, BALIST et IPOCAMP (Shillito *et al.*, 2008, 2014), il a été possible de comparer l'effet d'une remontée isobare et celle à décompression progressive ainsi que d'estimer l'effet des stress abiotiques sur la dynamique des associations symbiotiques. En utilisant ces méthodes, on a pu constater qu'il n'y avait pas de différences significatives au niveau du volume occupé par chacun des deux types de symbiontes associés aux animaux remontés à la surface sous pression ou non. Ceci valide *a posteriori* tous les études de quantification des symbiontes basées sur les volumes relatifs dans les bactériocytes effectuées auparavant. Néanmoins, l'état physiologique de deux partenaires de cette symbiose n'a pas encore été caractérisé. La remontée avec décompression peut donc être utilisée pour la quantification relative des symbiontes dans les tissus des hôtes, mais pour les analyses génomiques ou protéomiques, il est probablement préférable de remonter les animaux à la surface dans les enceintes pressurisées.

Le rapport entre les concentrations de sulfures et de méthane dans les fluides hydrothermaux influence l'abondance relative des bactéries sulfo-oxydantes et méthanotrophes dans les bactériocytes des moules (Duperron *et al.*, 2006). Dans cette étude, ce paramètre a été comparé chez les bathymodioles de deux sites, Menez Gwen et Rainbow. Après la remontée pressurisée, le volume occupé par les bactéries thiotrophes atteint respectivement 52,6% ± 4,9 et 43,7 % ± 6,4. Ces valeurs sont remarquablement proches de celles des études précédentes 53.1% ± 10.3 à Menez Gwen, versus 39.4% à Rainbow (Halary *et al.*, 2008; Le Bris and Duperron, 2010). Ces résultats confirment l'hypothèse d'ajustement de proportion de deux symbiontes en fonction des concentrations des substrats de leur métabolisme dans l'environnement (Trask and Van Dover, 1999; Fiala-Medioni *et al.*, 2002; Riou *et al.*, 2008) et suggèrent une certaine stabilité des conditions physico-chimiques de ces sites au cours du temps.

Au niveau de la réponse aux stress chimiques, le pourcentage des bactéries sulfo-oxydantes a doublé après le traitement aux sulfures et bicarbonate pendant 5 heures d'incubation à leur pression native. Ceci confirme les résultats des travaux précédents (Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008), mais dans notre cas la réponse a été encore plus rapide. Après l'ajout des carbonates seuls, la proportion des thiotrophes a également augmenté, dans une

moindre mesure. Les symbiontes ont probablement utilisé une autre source d'énergie pour la chimiosynthèse. Récemment, l'hydrogène a été proposé comme une source potentielle d'énergie pour les bactéries sulfo-oxydantes (Amend and Shock, 2001; Petersen *et al.*, 2011). L'utilisation des sulfures issus du métabolisme des moules est une autre possibilité. Dans un second test, une température sublétale de 25°C (Boutet *et al.*, 2009), a été appliquée pendant une heure aux animaux qui n'ont pas subi de décompression, même pendant le transfert entre les deux enceintes pressurisées PERISCOP et BALIST. Le pourcentage des bactéries sulfo-oxydantes dans les bactériocytes des moules a baissé très légèrement en réponse à ce choc thermique (de 57% ± 10,2 dans le contrôle, jusqu'à 50,8% ± 8,5). A notre niveau d'analyse, et sans préjuger des changements physiologiques sous-jacents, ce changement modéré n'a pas l'air d'avoir influencé l'interaction symbiotique au sein de *B. azoricus*. L'association semble donc bien résister aux chocs thermiques, ce qui est un atout pour un hôte peu mobile dans un environnement hydrothermal où de tels événements se produisent régulièrement. Les traitements appliqués paraissent être appropriés pour étudier la dynamique des associations symbiotiques. L'abondance et la composition des populations de symbiontes dans les tissus des métazoaires varient vite et ce type de réponses permet d'optimiser l'accès de l'holobionte aux ressources disponibles. Il reste à établir de quelle manière ces changements se réalisent : l'accroissement est-il dû à la multiplication des symbiontes ou à leur recrutement dans l'environnement, et la diminution est-elle liée à la digestion ou au rejet de symbiontes dans l'environnement ? Et bien sûr, de déterminer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette flexibilité.

9. Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse avait pour but de créer « un portrait » des symbiontes et de mieux comprendre les mécanismes de leurs associations avec les animaux, en particulier les bivalves. Les associations symbiotiques sont prises en considération à travers les cycles de vie des bactéries engagées. Dans les trois volets développés, différentes étapes de ces cycles ont été abordées, permettant ainsi de répondre à quelques questions importantes sur l'existence et l'abondance de bactéries apparentées aux symbiontes dans l'environnement, les modalités de la transmission verticale, et la flexibilité des associations symbiotiques dans les tissus animaux.

Dans le premier volet, la diversité et la distribution des formes libres de symbiontes et des bactéries apparentées dans les sources hydrothermales, les suintements froids et les débris organiques ont été documentées grâce aux modules de colonisation CHEMECOLI. Ces travaux sont encore en cours. De nouveaux colonisateurs ont été déployés sur la dorsale médio-atlantique sur les sites Rainbow, TAG et Snake Pit lors des campagnes BioBaz en 2013 et BICOSE en 2014, et plusieurs CHEMECOLIs en provenance du Pacifique par exemple, sont encore en attente d'analyse. Pour équilibrer le jeu de données, il faudrait augmenter le nombre d'échantillons à court et moyen-terme, ce qui est difficile compte tenu des contraintes des campagnes océanographiques qui ne permettent de repasser sur les sites qu'une fois par an au mieux. D'autres types de substrats restent à tester, par exemple les carbonates qui sont toujours parmi les échantillons non-analysés suite à des difficultés d'extraction d'ADN, et malgré plusieurs tentatives et protocoles utilisés. La nécessité de séquencer et d'analyser les échantillons en réplicats a été soulignée (Prosser, 2010), et les échantillons ont été traités en duplicats jusqu'ici ce qui devra être poursuivi. Finalement, pour augmenter la résolution des OTUs, il conviendrait d'augmenter la longueur des séquences issues du pyroséquençage, grâce à des technologies qui se mettent en place et permettront l'analyse de séquences de longueurs similaires à celles du séquençage Sanger. Ceci permettrait d'augmenter la précision de triage des séquences dans les OTU et d'améliorer leur identification taxonomique. Enfin, une approche de génomique pourrait être intéressante pour identifier les gènes liés à la symbiose dans l'environnement, en comparant avec les quelques métagénomes de symbiontes chimiotrophes disponibles (Kuwahara *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2007, 2008; Kleiner *et al.*, 2012).

Dans le deuxième volet de ce travail, les symbiontes ont été détectés, identifiés et localisés dans les gamètes femelles et les stades post-larvaires précoces d'*Isorropodon bigoti* de la famille Vesicomyidae, ce qui confirme sans aucun doute la transmission principalement maternelle des symbiontes dans ce groupe de bivalves. Pour compléter cette étude, il faudrait analyser la translocation des symbiontes dans les tissus animaux afin de comprendre comment ils passent des branchies aux gonades, et *vice versa,* au cours du développement. Pour cela, il faudrait pouvoir les maintenir en élevage et maitriser le cycle complet de vie de l'hôte pour obtenir un nombre plus élevé de spécimens des deux sexes et à différents stades de développement. Puisque *I. bigoti* du golfe de Guinée est de petite taille et peut vivre dans les sites peu profonds, une culture dans des aquariums au laboratoire est envisageable, de la même façon que *Bathymodiolus azoricus* du site Menez Gwen sur la dorsale médio-atlantique a été maintenu dans les aquariums LabHorta aux Açores. L'accès aux animaux vivants faciliterait l'étude de sa physiologie et sa reproduction. Au besoin, des espèces côtières proches pourraient être testées pour certains groupes comme les Thyasiridae. L'identité des symbiontes dans les gamètes pourrait être confirmée au moyen de microdissection et avec des outils moléculaires comme la technique WGA (Whole-Genome Amplification – Amplification du Génome Entier), permettant de séquencer le génome à partir de l'ADN extrait d'une seule cellule qui pourrait être un simple ovocyte mûr (Woyke *et al.*, 2009, 2010; Siegl *et al.*, 2011). Le cycle de vie de l'animal pourrait être aussi bouclé et l'abondance des symbiontes analysée à chaque étape : dès les gamètes, depuis les larves, post-larves et juvéniles jusqu'aux adultes. Si on disposait d'animaux contenant deux populations de symbiontes, le transfert latéral de ces derniers pourrait être testé comme cela a déjà été fait chez les Lucinidae (Gros et al., 1998, 2012). On pourrait comprendre à quel moment du cycle de vie de l'animal l'échange des symbiontes ait lieu, si telle échange existe, et si un symbionte acquis depuis l'environnement pourrait ensuite être transmis verticalement.

La dernière partie de ma thèse concernait l'effet de facteurs environnementaux et de stress abiotiques sur la dynamique des populations de symbiontes dans les branchies de *B. azoricus*. Pour la première fois, les moules *Bathymodiolus azoricus* ont été remontées dans l'enceinte pressurisée PERISCOP (Shillito *et al.*, 2008). Pour la première fois aussi, une série d'expériences de stress *in vivo* a pu être effectuée dans les conditions natives de pression. Ces travaux sont toujours en cours d'analyse, néanmoins nous avons pu démontrer que la façon de remonter des moules ne modifiait pas la fraction de volume occupé par deux types de symbiontes dans les bactériocytes. Cette conclusion valide la recherche menée jusqu'à

maintenant sur les moules soumises à la décompression lors de l'échantillonnage. En revanche, nous ne pouvons rien dire sur l'état physiologique ni des moules, ni de leurs symbiontes. Pour cela, il faudrait analyser l'expression des gènes par q-RT-PCR ou RNASeq et éventuellement comparer les protéomes des animaux et leur symbiontes lors de la remontée pressurisée et non pressurisée. L'abondance relative entre les deux types de symbiontes est différente entre les deux sites Rainbow et Menez Gwen, mais les valeurs restent similaires à celles déjà publiées il y a quelques années suggérant la stabilité relative *in situ*. La réponse au stress chimique est rapide et se manifeste par l'augmentation du volume des bactéries sulfo-oxydantes dans les bactériocytes pendant l'exposition des moules aux sulfures et la source de carbone inorganique. L'effet contraire a été observé après le choc thermique. Pour compléter cette étude, d'autres traitements sont envisageables, notamment des incubations en présence de méthane ou de méthanol, qui ont été effectuées lors de la campagne BICOSE sur le site TAG et sont en attente d'analyse. L'ensemble des analyses ont été réalisées avec deux méthodologies complémentaires : trois type d'approches basées sur le FISH (2D, 3D et bactériocyte) et deux approches moléculaires (454 pyroséquençage – premier réplicat séquencé et PCR quantitative – en cours). Par ailleurs, il conviendrait d'examiner de quelle manière et par quel partenaire les populations de symbiontes sont régulées en recherchant des marqueurs de division, de digestion et d'apoptose des cellules, ainsi que des signes de relargage de bactéries dans l'environnement.

La présente étude ne saurait répondre de manière définitive aux questions posées initialement concernant la symbiose dans les écosystèmes chimiosynthétiques, mais elle donne un nouvel angle à la recherche menée sur ce sujet, et défriche certains domaines tels que la recherche de formes libres de symbiontes à l'aide d'expériences de colonisation ou l'expérimentation sous pression pour l'étude de la dynamique des populations de symbiontes dans les tissus animaux. Après avoir effectué l'ensemble des travaux rapportés dans ce manuscrit, une conclusion commune pour tous les volets peut être formulée. Pour affiner et généraliser les résultats obtenus dans cette étude, il faut augmenter le nombre et la diversité des échantillons analysés. Ceci est un problème connu dans la majorité des laboratoires qui travaillent dans le domaine des milieux marins profonds. Le temps de travail à bord du bateau et le nombre des missions océanographiques étant toujours limités, la recherche ultérieure au laboratoire est par conséquent le plus souvent restreinte aux échantillons fixés auparavant, sans la possibilité de les répliquer ou de les reproduire dans les mêmes conditions. C'est pourquoi il conviendrait également de s'interroger sur la pertinence de modèles analogues

plus faciles d'accès, telles des espèces apparentées mais vivant en zone moins profonde. De telles espèces n'existent que pour certains des taxons étudiés ici, mais leur étude pourrait être riche d'enseignements et déboucher sur la mise au point de protocoles efficaces transposables aux espèces profondes.

Mon projet scientifique personnel, à part des finitions nécessaires et énumérées ci-dessus, aurait consisté en une analyse comparative à plusieurs niveaux, de quelques espèces symbiotiques des bivalves, proches entre elles et au sein de la même famille, qui colonisent des habitats différents au niveau physico-chimique et qui vivent à diverses profondeurs. J'aurais appliqué une approche génomique, pour séquencer les génomes des deux partenaires de la symbiose. L'étude des transcriptomes et protéomes pourrait permettre le suivi des dosages *in vivo* de substrats des bactéries symbiotiques, dans les conditions natives de pression et de température, grâce au maintien des animaux dans les aquariums à haute pression. Cette analyse pourrait donner la réponse complète sur le métabolisme et l'adaptation de l'holobionte aux conditions variables de l'environnement.

Pour étudier la reproduction et la transmission des symbiontes en détail, je voudrais maintenir des animaux en culture. Premièrement je voudrais confirmer si le relargage des symbiontes est possible et analyser si le transfert latéral des bactéries a lieu entre les espèces et quelles sont les conditions nécessaires. Disposant des larves de ces animaux, les prédictions sur leur connectivité entre des différents sites pourraient être faites. Finalement, ces larves pourraient être utilisées dans des modèles de dispersion où l'eau est turbide, suite à la levée d'un panache de particules du sédiment, comme dans le cas d'exploitation minière. Je pense que l'exploitation des grands fonds marins est inévitable dans quelques décennies, il faut donc faire un effort scientifique pour estimer et décrire en détail l'influence des interventions humaines dans ces écosystèmes. Ceci nécessiterait plus d'échantillons, plus de campagnes océanographiques, mais seulement l'image complexe, basée sur les comparaisons de quelques modèles biologiques pouvant expliquer la complexité des associations symbiotiques dans ces habitats extrêmes. Avec les moyens techniques disponibles, il est temps d'effectuer les expériences similaires qui sont faits en cas des symbioses des plantes ou des insectes avec leurs partenaires bactériens.

Bibliographie

Adin, D.M., Phillips, N.J., Gibson, B.W., Apicella, M.A., Ruby, E.G., McFall-Ngai, M.J., Hall, D.B., and Stabb, E.V. (2008) Characterization of htrB and msbB Mutants of the Light Organ Symbiont Vibrio fischeri. *Appl Environ Microbiol* **74**: 633–644.

Aharon, P. (1994) Geology and biology of modern and ancient submarine hydrocarbon seeps and vents: An introduction. *Geo-Mar Lett* **14**: 69–73.

Aida, M., Kanemori, M., Kubota, N., Matada, M., Sasayama, Y., and Fukumori, Y. (2008) Distribution and Population of Free-Living Cells Related to Endosymbiont A Harbored in *Oligobrachia mashikoi* (a Siboglinid Polychaete) Inhabiting Tsukumo Bay. *Microbes Environ* **23**: 81–88.

Aloisi, G., Pierre, C., Rouchy, J.-M., Foucher, J.-P., and Woodside, J. (2000) Methane-related authigenic carbonates of eastern Mediterranean Sea mud volcanoes and their possible relation to gas hydrate destabilisation. *Earth Planet Sci Lett* **184**: 321–338.

Alt, J.C. (1995) Subseafloor processes in mid-ocean ridge hydrothennal systems. In *Geophysical Monograph Series*. Humphris, S.E., Zierenberg, R.A., Mullineaux, L.S., and Thomson, R.E. (eds). American Geophysical Union, Washington, D. C. pp. 85–114.

Amend, J.P., and Shock, E.L. (2001) Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 175–243.

Arellano, S.M., Gaest, A.L.V., Johnson, S.B., Vrijenhoek, R.C., and Young, C.M. (2014) Larvae from deep-sea methane seeps disperse in surface waters. *Proc R Soc B Biol Sci* **281**: 20133276.

Bachy, C., Dolan, J.R., López-García, P., Deschamps, P., and Moreira, D. (2013) Accuracy of protist diversity assessments: morphology compared with cloning and direct pyrosequencing of 18S rRNA genes and ITS regions using the conspicuous tintinnid ciliates as a case study. *ISME J* **7**: 244–255.

Baco, A.R., and Smith, C.R. (2003) High species richness in deep-sea chemoautotrophic whale skeleton communities. *Mar Ecol Prog Ser* **260**: 109–114.

Bates, A.E. (2007) Feeding strategy, morphological specialisation and presence of bacterial episymbionts in lepetodrilid gastropods from hydrothermal vents. *Mar Ecol Prog Ser* **347**: 87–99.

Baumann, P., Moran, N.A., and Baumann, L. (1997) The evolution and genetics of aphid endosymbionts. *Bioscience* **47**: 12–20.

Bayon, G., Loncke, L., Dupre, S., Caprais, J.-C., Ducassou, E., Duperron, S., Etoubleau, J., Foucher, J.-P., Fouquet, Y., Gontharet, S., Henderson, G.M., Huguen, C., Klaucke, I., Mascle, J., Migeon, S., Roy, K.O.-L., Ondreas, H., Pierre, C., Sibuet, M., Stadnitskaia, A., and Woodside, J. (2009) Multi-disciplinary investigation of fluid seepage on an unstable margin: The case of the Central Nile deep sea fan. *Mar Geol* **261**: 92–104.

Beaulieu, S., Joyce, K., and Soule, S.A. (2010) Global Ditribution of Hydrothermal Vent Fields. www.interridge.org

Becker, E.L., Lee, R.W., Macko, S.A., Faure, B.M., and Fisher, C.R. (2010) Stable carbon and nitrogen isotope compositions of hydrocarbon-seep bivalves on the Gulf of Mexico lower continental slope. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* **57**: 1957–1964.

Bennett, B., Smith, C., Glaser, B., and Maybaum, H. (1994) Faunal Community Structure of a Chemoautotrophic Assemblage on Whale Bones in the Deep Northeast Pacific-Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* **108**: 205–223.

Bienhold, C., Pop Ristova, P., Wenzhöfer, F., Dittmar, T., and Boetius, A. (2013) How Deep-Sea Wood Falls Sustain Chemosynthetic Life. *PLoS ONE* **8**: e53590.

Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B.B., Witte, U., and Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623–626.

Borowski, C., Giere, O., Krieger, J., Amann, R., and Dubilier, N. (2002) New aspects of the symbiosis in the provannid snail *Ifremeria nautilei* from the North Fiji Back Arc Basin. *Cahiers de biologie marine* **43**: 321–324.

Boutet, I., Tanguy, A., Guen, D. Le, Piccino, P., Hourdez, S., Legendre, P., and Jollivet, D. (2009) Global depression in gene expression as a response to rapid thermal changes in vent mussels. *Proc Biol Sci* **276**: 3071–3079.

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

Bright, M., and Giere, O. (2005) Microbial symbiosis in Annelida. *Symbiosis* **38**: 1–45.

Bris, N. Le, and Duperron, S. (2010) Chemosynthetic communities and biogeochemical energy pathways along the Mid-Atlantic Ridge: The case of *Bathymodiolus azoricus*. In *Diversity Of Hydrothermal Systems On Slow Spreading Ocean Ridges*. Rona, P.A., Devey, C.W., Dyment, J., and Murton, B.J. (eds). American Geophysical Union, pp. 409–429.

Brissac, T., Rodrigues, C.F., Gros, O., and Duperron, S. (2011) Characterization of bacterial symbioses in *Myrtea* sp. (Bivalvia: Lucinidae) and *Thyasira* sp. (Bivalvia: Thyasiridae) from a cold seep in the Eastern Mediterranean. *Mar Ecol* **32**: 198–210.

Brissac, T., Gros, O., and Merçot, H. (2009) Lack of endosymbiont release by two Lucinidae (Bivalvia) of the genus *Codakia*: consequences for symbiotic relationships. *FEMS Microbiol Ecol* **67**: 261–267.

Buchner, P. (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. *Intersci N Y* .

Bulgheresi, S., Schabussova, I., Chen, T., Mullin, N.P., Maizels, R.M., and Ott, J.A. (2006) A New C-Type Lectin Similar to the Human Immunoreceptor DC-SIGN Mediates Symbiont Acquisition by a Marine Nematode. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2950–2956.

Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., and Takai, K. (2006) The versatile ϵ-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol* **4**: 458–468.

Campbell, B.J., and Cary, S.C. (2004) Abundance of Reverse Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Free-Living Microorganisms at Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6282–6289.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., and Knight, R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**: 335–336.

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

Caro, A., Got, P., Bouvy, M., Troussellier, M., and Gros, O. (2009) Effects of Long-Term Starvation on a Host Bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and Its Symbiont Population. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3304–3313.

Caro, A., Gros, O., Got, P., Wit, R.D., and Troussellier, M. (2007) Characterization of the Population of the Sulfur-Oxidizing Symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by Single-Cell Analyses. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2101–2109.

Cary, S., and Giovannoni, S. (1993) Transovarial Inheritance of Endosymbiotic Bacteria in Clams Inhabiting Deep-Sea Hydrothermal Vents and Cold Seeps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5695–5699.

Cary, S.C., Cottrell, M.T., Stein, J.L., Camacho, F., and Desbruyeres, D. (1997) Molecular Identification and Localization of Filamentous Symbiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1124–1130.

Cary, S.C. (1994) Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve *Solemya reidi*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **3**: 121–30.

Cavanaugh, C.M., McKiness, Z.P., Newton, I.L.G., and Stewart, F.J. (2006) Marine Chemosynthetic Symbioses. In *The Prokaryotes*. Dr, M.D.P., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds). Springer New York, pp. 475–507.

Cavanaugh, C.M., Abbott, M.S., and Veenhuis, M. (1988) Immunochemical localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the symbiont-containing gills of *Solemya velum* (Bivalvia: Mollusca). *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7786–7789.

Cavanaugh, C.M., Levering, P.R., Maki, J.S., Mitchell, R., and Lidstrom, M.E. (1987) Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* **325**: 346–348.

Cavanaugh, C.M. (1983) Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature* **302**: 58–61.

Cavanaugh, C.M., Gardiner, S.L., Jones, M.L., Jannasch, H.W., and Waterbury, J.B. (1981) Prokaryotic Cells in the Hydrothermal Vent Tube Worm *Riftia pachyptila* Jones: Possible Chemoautotrophic Symbionts. *Science* **213**: 340–342.

Cermeño, P., and Falkowski, P.G. (2009) Controls on Diatom Biogeography in the Ocean. *Science* **325**: 1539–1541.

Childress, J.J., Fisher, C.R., Brooks, J.M., Kennicutt, M.C., 2nd, Bidigare, R., and Anderson, A.E. (1986) A methanotrophic marine molluscan (bivalvia, mytilidae) symbiosis: mussels fueled by gas. *Science* **233**: 1306–1308.

Cleveland, L.R. (1926) Symbiosis Among Animals with Special Reference to Termites and Their Intestinal Flagellates. *Q Rev Biol* **1**: 51–60.

Coleman, R.G. (1971) Petrologic and Geophysical Nature of Serpentinites. *Geol Soc Am Bull* **82**: 897–918.

Corbari, L., Zbinden, M., CambonBonavita, M., Gaill, F., and Compre, 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.

Cordes, E.E., Cunha, M.R., Galéron, J., Mora, C., Olu-Le Roy, K., Sibuet, M., Gaever, S. Van, Vanreusel, A., and Levin, L.A. (2010) The influence of geological, geochemical, and biogenic habitat heterogeneity on seep biodiversity. *Mar Ecol* **31**: 51–65.

Cordes, E.E., Bergquist, D.C., and Fisher, C.R. (2009) Macro-Ecology of Gulf of Mexico Cold Seeps. *Annu Rev Mar Sci* **1**: 143–168.

Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., Herzen, R.P. von, Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K., and Andel, T.H. van (1979) Submarine Thermal Sprirngs on the Galápagos Rift. *Science* **203**: 1073–1083.

Cosel, R. von, and Olu, K. (2009) Large Vesicomyidae (Mollusca: Bivalvia) from cold seeps in the Gulf of Guinea off the coasts of Gabon, Congo and northern Angola. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* **56**: 2350–2379.

Cosel, R. von, Salas, C., and Høisæter, T. (2001) Vesicomyidae (Mollusca: Bivalvia) of the genera *Vesicomya*, *Waisiuconcha*, *Isorropodon* and *Callogonia* in the eastern Atlantic and the Mediterranean. *Sarsia* **86**: 333–366.

Cosel, R. Von, Cosel, R.V., Comtet, T., and Krylova, E.M. (1999) *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *Veliger* **42**: 218–248.

Cunha, M.R., Matos, F.L., Genio, L., Hilario, A., Moura, C.J., Ravara, A., and Rodrigues, C.F. (2013a) Are Organic Falls Bridging Reduced Environments in the Deep Sea? - Results from Colonization Experiments in the Gulf of Cadiz. *Plos One* **8**: e76688.

Cunha, M.R., Rodrigues, C.F., Génio, L., Hilário, A., Ravara, A., and Pfannkuche, O. (2013b) Macrofaunal assemblages from mud volcanoes in the Gulf of Cadiz: abundance, biodiversity and diversity partitioning across spatial scales. *Biogeosciences* **10**: 2553–2568.

Damm, K.L. Von (1995) Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids. In *Geophysical Monograph Series*. Humphris, S.E., Zierenberg, R.A., Mullineaux, L.S., and Thomson, R.E. (eds). American Geophysical Union, Washington, D. C. pp. 222–247.

Dando, P.R. (2010) Biological Communities at Marine Shallow-Water Vent and Seep Sites. In *The Vent and Seep Biota*. Kiel, S. (ed.). Springer Netherlands, pp. 333–378.

Decker, C., Olu, K., Arnaud-Haond, S., and Duperron, S. (2013) Physical Proximity May Promote Lateral Acquisition of Bacterial Symbionts in Vesicomyid Clams. *PLoS ONE* **8**: e64830.

Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J.-C., Colaço, A., Comtet, T., Crassous, P., Fouquet, Y., Khripounoff, A., Bris, N. Le, 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 Oceanogr Res Pap* **48**: 1325–1346.

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

Distel, D.L., Baco, A.R., Chuang, E., Morrill, W., Cavanaugh, C., and Smith, C.R. (2000) Marine ecology - Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? *Nature* **403**: 725–726.

Distel, D.L., and Roberts, S.J. (1997) Bacterial endosymbionts in the gills of the deep-sea wood-boring bivalves *Xylophaga atlantica* and *Xylophaga washingtona*. *Biol Bull* **192**: 253–261.

Distel, D.L., Lee, H.K., and Cavanaugh, C.M. (1995) Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9598–9602.

Distel, D.L., and Wood, A.P. (1992) Characterization of the Gill Symbiont of *Thyasira flexuosa* (Thyasiridae: Bivalvia) by Use of Polymerase Chain Reaction and 16S rRNA Sequence Analysis. *J Bacteriol* **174**: 6317–6320.

Distel, D.L., Lane, D.J., Olsen, G.J., Giovannoni, S.J., Pace, B., Pace, N.R., Stahl, D.A., and Felbeck, H. (1988) Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. *J Bacteriol* **170**: 2506–2510.

Douglas, A.E. (2010) *The Symbiotic Habit*. Princeton University Press, Princeton, N.J.

Douglas, A.E. (2007) Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Trends Biotechnol* **25**: 338–342.

Douglas, A.E. (1994) *Symbiotic Interactions*. Oxford University Press, Oxford ; New York.

Dover, C. Van (2000) *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton University Press, Princeton, N.J.

Dover, C.L. Van (2001) Biogeography and Ecological Setting of Indian Ocean Hydrothermal Vents. *Science* **294**: 818–823.

Dover, C.L.V. Van, German, C.R., Speer, K.G., Parson, L.M., and Vrijenhoek, R.C. (2002) Evolution and Biogeography of Deep-Sea Vent and Seep Invertebrates. *Science* **295**: 1253–1257.

Dover, C.L.V. Van, 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.

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

Dubilier, N., Mülders, C., Ferdelman, T., Beer, D. de, Pernthaler, A., Klein, M., Wagner, M., Erséus, C., Thiermann, F., Krieger, J., Giere, O., and Amann, R. (2001) Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* **411**: 298–302.

Dufour, S.C., and Felbeck, H. (2006) Symbiont abundance in thyasirids (Bivalvia) is related to particulate food and sulphide availability. *Mar Ecol Prog Ser* **320**: 185–194.

Dufour, S.C. (2005) Gill Anatomy and the Evolution of Symbiosis in the Bivalve Family Thyasiridae. *Biol Bull* **208**: 200–212.

Dufour, S.C., and Felbeck, H. (2003) Sulphide mining by the superextensile foot of symbiotic thyasirid bivalves. *Nature* **426**: 65–67.

Duperron, S., Gaudron, S.M., Rodrigues, C.F., Cunha, M.R., Decker, C., and Olu, K. (2013a) An overview of chemosynthetic symbioses in bivalves from the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **10**: 3241–3267.

Duperron, S., Pottier, M.-A., Léger, N., Gaudron, S.M., Puillandre, N., Prieur, S. Le, Sigwart, J.D., Ravaux, J., and Zbinden, M. (2013b) A tale of two chitons: is habitat specialisation linked to distinct associated bacterial communities? *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 552–567.

Duperron, S., Rodrigues, C.F., Léger, N., Szafranski, K., Decker, C., Olu, K., and Gaudron, S.M. (2012) Diversity of symbioses between chemosynthetic bacteria and metazoans at the Guiness cold seep site (Gulf of Guinea, West Africa). *MicrobiologyOpen* **1**: 467–480.

Duperron, S., Guezi, H., Gaudron, S.M., Pop Ristova, P., Wenzhöfer, F., and Boetius, A. (2011) Relative abundances of methane- and sulphur-oxidising symbionts in the gills of a cold seep mussel and link to their potential energy sources. *Geobiology* **9**: 481–491.

Duperron, S. (2010) The Diversity of Deep-Sea Mussels and Their Bacterial Symbioses. In *The Vent and Seep Biota*. Kiel, S. (ed.). Springer Netherlands, pp. 137–167.

Duperron, S., Beer, D. De, Zbinden, M., Boetius, A., Schipani, V., Kahil, N., and Gaill, F. (2009a) Molecular characterization of bacteria associated with the trophosome and the tube of *Lamellibrachia* sp., a siboglinid annelid from cold seeps in the eastern Mediterranean. *FEMS Microbiol Ecol* **69**: 395–409.

Duperron, S., Lorion, J., Samadi, S., Gros, O., and Gaill, F. (2009b) Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *C R Biol* **332**: 298–310.

Duperron, S., Laurent, M.C.Z., Gaill, F., and Gros, O. (2008a) Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of Mytilidae associated with wood falls. *Fems Microbiol Ecol* **63**: 338–349.

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

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.

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

Dupré, S., Woodside, J., Klaucke, I., Mascle, J., and Foucher, J.-P. (2010) Widespread active seepage activity on the Nile Deep Sea Fan (offshore Egypt) revealed by high-definition geophysical imagery. *Mar Geol* **275**: 1–19.

Edmonds, H.N., Michael, P.J., Baker, E.T., Connelly, D.P., Snow, J.E., Langmuir, C.H., Dick, H.J.B., Mühe, R., German, C.R., and Graham, D.W. (2003) Discovery of abundant hydrothermal venting on the ultraslow-spreading Gakkel ridge in the Arctic Ocean. *Nature* **421**: 252–256.

Elsaied, H., and Naganuma, T. (2001) Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1751–1765.

Endow, K., and Ohta, S. (1990) Occurrence of Bacteria in the Primary Oocytes of Vesicomyid Clam *Calyptogena soyoae*. *Mar Ecol-Prog Ser* **64**: 309–311.

ESCo (2014) Expertise scientifique collective sur les impacts environnementaux de l'exploration et de l'exploitation des ressources minérales profondes. .

Espinosa, E.P., Tanguy, A., Panse, S. Le, Lallier, F., Allam, B., and Boutet, I. (2013) Endosymbiotic bacteria in the bivalve *Loripes lacteus*: Localization, characterization and aspects of symbiont regulation. *J Exp Mar Biol Ecol* **448**: 327–336.

Eutick, M.L., Veivers, P., O'Brien, R.W., and Slaytor, M. (1978) Dependence of the higher termite, *Nasutitermes exitiosus* and the lower termite, *Coptotermes lacteus* on their gut flora. *J Insect Physiol* **24**: 363–368.

Fagervold, S.K., Romano, C., Kalenitchenko, D., Borowski, C., Nunes-Jorge, A., Martin, D., and Galand, P.E. (2014) Microbial Communities in Sunken Wood Are Structured by Wood-Boring Bivalves and Location in a Submarine Canyon. *PLoS ONE* **9**: e96248.

Fagervold, S.K., Bessette, S., Romano, C., Martin, D., Plyuscheva, M., Bris, N. Le, and Galand, P.E. (2013) Microbial communities associated with the degradation of oak wood in the Blanes submarine canyon and its adjacent open slope (NW Mediterranean). *Prog Oceanogr* **118**: 137–143.

Fagervold, S.K., Galand, P.E., Zbinden, M., Gaill, F., Lebaron, P., and Palacios, C. (2012) Sunken woods on the ocean floor provide diverse specialized habitats for microorganisms. *Fems Microbiol Ecol* **82**: 616–628.

Felbeck, H. (1981) Chemoautotrophic Potential of the Hydrothermal Vent Tube Worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* **213**: 336–338.

Feldman, R.A., Shank, T.M., Black, M.B., Baco, A.R., Smith, C.R., and Vrijenhoek, R.C. (1998) Vestimentiferan on a whale fall. *Biol Bull* **194**: 116–119.

Fiala-Medioni, A., McKiness, Z.P., Dando, P., Boulegue, J., Mariotti, A., Alayse-Danet, A.M., Robinson, J.J., and Cavanaugh, C.M. (2002) Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Mar Biol* **141**: 1035–1043.

Fiala-Medioni, A., and Metivier, C. (1986) Ultrastructure of the Gill of the Hydrothermal Vent Bivalve *Calyptogena magnifica*, with a Discussion of Its Nutrition. *Mar Biol* **90**: 215–222.

Fiala-Médioni, A., Alayse, A.M., and Cahet, G. (1986) Evidence of *in situ* uptake and incorporation of bicarbonate and amino acids by a hydrothermal vent mussel. *J Exp Mar Biol Ecol* **96**: 191–198.

First Census of Marine Life 2010: Highlights of a Decade of Discovery (2010) Census of Marine Life International, Washington.

Fisher, C.R., Brooks, J.M., Vodenichar, J.S., Zande, J.M., Childress, J.J., and Jr., R.A.B. (1993) The Co-occurrence of Methanotrophic and Chemoautotrophic Sulfur-Oxidizing Bacterial Symbionts in a Deep-sea Mussel. *Mar Ecol* **14**: 277–289.

Flores, J.F., Fisher, C.R., Carney, S.L., Green, B.N., Freytag, J.K., Schaeffer, S.W., and Royer, W.E. (2005) Sulfide binding is mediated by zinc ions discovered in the crystal structure of a hydrothermal vent tubeworm hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2713–2718.

Fujiwara, Y., Kawato, M., Yamamoto, T., Yamanaka, T., Sato-Okoshi, W., Noda, C., Tsuchida, S., Komai, T., Cubelio, S.S., Sasakis, T., Jacobsen, K., Kubokawa, K., Fujikura, K., Maruyama, T., Furushima, Y., Okoshi, K., Miyake, H., Miyazaki, M., Nogi, Y., Yatabe, A., and Okutani, T. (2007) Three-year investigations into sperm whale-fall ecosystems in Japan. *Mar Ecol- Evol Perspect* **28**: 219–232.

Fujiwara, Y., Takai, K., Uematsu, K., Tsuchida, S., Hunt, J.C., and Hashimoto, J. (2000) Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distributions. *Mar Ecol Prog Ser* **208**: 147–155.

Funk, D.J., Wernegreen, J.J., and Moran, N.A. (2001) Intraspecific variation in symbiont genomes: Bottlenecks and the aphid-buchnera association. *Genetics* **157**: 477–489.

Fustec, A., Desbruyères, D., and Juniper, S.K. (1987) Deep-Sea Hydrothermal Vent Communities at 13°N on the East Pacific Rise: Microdistribution and Temporal Variations. *Biol Oceanogr* **4**: 121–164.

Gaudron, S.M., Demoyencourt, E., and Duperron, S. (2012) Reproductive Traits of the Cold-Seep Symbiotic Mussel *Idas modiolaeformis*: Gametogenesis and Larval Biology. *Biol Bull* **222**: 6–16.

Gaudron, S.M., Pradillon, F., Pailleret, M., Duperron, S., Bris, N. Le, and Gaill, F. (2010) Colonization of organic substrates deployed in deep-sea reducing habitats by symbiotic species and associated fauna. *Mar Env Res* **70**: 1–12.

Gebruk, A., Pimenov, N., and Savvichev, A. (1993) Feeding Specialization of Bresiliid Shrimps in the Tag Site Hydrothermal Community. *Mar Ecol Prog Ser* **98**: 247–253.

German, C.R., Baker, E.T., Mevel, C., Tamaki, K., and the FUJI Science Team (1998) Hydrothermal activity along the southwest Indian ridge. *Nature* **395**: 490–493.

Ghiglione, J.-F., Galand, P.E., Pommier, T., Pedrós-Alió, C., Maas, E.W., Bakker, K., Bertilson, S., Kirchman, D.L., Lovejoy, C., Yager, P.L., and Murray, A.E. (2012) Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 17633–17638.

Giere, O., and Langheld, C. (1987) Structural organisation, transfer and biological fate of endosymbiotic bacteria in gutless oligochaetes. *Mar Biol* **93**: 641–650.

Glover, A.G., Kallstrom, B., Smith, C.R., and Dahlgren, T.G. (2005) World-wide whale worms? A new species of *Osedax* from the shallow north Atlantic. *Proc R Soc B Biol Sci* **272**: 2587–2592.

Goffredi, S., Hurtado, L., Hallam, S., and Vrijenhoek, R. (2003) Evolutionary relationships of deep-sea vent and cold seep clams (Mollusca: Vesicomyidae) of the "pacifica/lepta" species complex. *Mar Biol* **142**: 311–320.

Goffredi, S.K., Jones, W.J., Erhlich, H., Springer, A., and Vrijenhoek, R.C. (2008a) Epibiotic bacteria associated with the recently discovered Yeti crab, *Kiwa hirsuta*. *Environ Microbiol* **10**: 2623–2634.

Goffredi, S.K., Wilpiszeski, R., Lee, R., and Orphan, V.J. (2008b) Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California. *ISME J* **2**: 204–220.

Goffredi, S.K., Johnson, S.B., and Vrijenhoek, R.C. (2007) Genetic diversity and potential function of microbial symbionts associated with newly discovered species of *Osedax* polychaete worms. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2314–2323.

Goffredi, S.K., Orphan, V.J., Rouse, G.W., Jahnke, L., Embaye, T., Turk, K., Lee, R., and Vrijenhoek, R.C. (2005) Evolutionary innovation: a bone-eating marine symbiosis. *Environ Microbiol* **7**: 1369–1378.

Govenar, B. (2012) Energy Transfer Through Food Webs at Hydrothermal Vents: Linking the Lithosphere to the Biosphere. *Oceanography* **25**: 246–255.

Govenar, B. (2010) Shaping Vent and Seep Communities: Habitat Provision and Modification by Foundation Species. In *The Vent and Seep Biota*. Kiel, S. (ed.). Springer Netherlands, pp. 403–432.

Grassle, J.F. (1985) Hydrothermal Vent Animals: Distribution and Biology. *Science* **229**: 713–717.

Gros, O., Elisabeth, N.H., Gustave, S.D.D., Caro, A., and Dubilier, N. (2012) Plasticity of symbiont acquisition throughout the life cycle of the shallow-water tropical lucinid *Codakia orbiculata* (Mollusca: Bivalvia). *Environ Microbiol* **14**: 1584–1595.

Gros, O., Liberge, M., Heddi, A., Khatchadourian, C., and Felbeck, H. (2003) Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (Thalassia testudinum environment). *Appl Environ Microbiol* **69**: 6264–6267.

Gros, O., Frenkiel, L., and Mouëza, M. (1998) Gill filament differentiation and experimental colonization by symbiotic bacteria in aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebr Reprod Amp Dev* **34**: 219–231.

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

Haddad, A., Camacho, F., Durand, P., and Cary, S.C. (1995) Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1679–1687.

Halanych, K.M. (2005) Molecular phylogeny of siboglinid annelids (a.k.a. pogonophorans): a review. **535-536**: 297–307.

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*. *ISME J* **2**: 284–292.

Hannington, M.D., Ronde, C.D.J. de, and Petersen, S. (2005) Sea-floor tectonics and submarine hydrothermal systems. In *Economic Geology 100th Anniversary Volume*. Hedenquist, J.W., Thompson, J.F.H., Goldfarb, R.J., and Richards, J.P. (eds). Society of Economic Geologists, Littelton, Colorado, USA. pp. 111–141.

Hanson, R.S., and Hanson, T.E. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* **60**: 439–471.

Harmer, T.L., Rotjan, R.D., Nussbaumer, A.D., Bright, M., Ng, A.W., DeChaine, E.G., and Cavanaugh, C.M. (2008) Free-Living Tube Worm Endosymbionts Found at Deep-Sea Vents. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3895–3898.

Heijden, K. van der, Petersen, J.M., Dubilier, N., and Borowski, C. (2012) Genetic Connectivity between North and South Mid-Atlantic Ridge Chemosynthetic Bivalves and Their Symbionts. *PLoS ONE* **7**: e39994.

Hessler, R.R., and Smithey, W.M. (1983) The Distribution and Community Structure of Megafauna at the Galapagos Rift Hydrothermal Vents. In *Hydrothermal Processes at Seafloor Spreading Centers*. Rona, P.A., Boström, K., Laubier, L., and Smith, K.L. (eds). Springer US, pp. 735–770.

Hongoh, Y., Ohkuma, M., and Kudo, T. (2003) Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol Ecol* **44**: 231–242.

Huber, J.A., Welch, D.B.M., Morrison, H.G., Huse, S.M., Neal, P.R., Butterfield, D.A., and Sogin, M.L. (2007) Microbial Population Structures in the Deep Marine Biosphere. *Science* **318**: 97–100.

Huguen, C., Mascle, J., Chaumillon, E., Kopf, A., Woodside, J., and Zitter, T. (2004) Structural setting and tectonic control of mud volcanoes from the Central Mediterranean Ridge (Eastern Mediterranean). *Mar Geol* **209**: 245–263.

Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G., and Sogin, M.L. (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* **12**: 1889–1898.

Huse, S.M., Huber, J.A., Morrison, H.G., Sogin, M.L., and Welch, D. (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol* **8**: R143.

Jacob, M., Soltwedel, T., Boetius, A., and Ramette, A. (2013) Biogeography of Deep-Sea Benthic Bacteria at Regional Scale (LTER HAUSGARTEN, Fram Strait, Arctic). *PLoS ONE* **8**: e72779.

Jannasch, H.W., and Nelson, D. C. (1984) Recent progress in the microbiology of hydrothermal vents. In *Current Perspectives in Microbial Ecology*. Amer. Soc. Microbiol. Publ., Washington. pp. 170–176.

Johnson, K.S., Childress, J.J., Hessler, R.R., Sakamoto-Arnold, C.M., and Beehler, C.L. (1988) Chemical and biological interactions in the Rose Garden hydrothermal vent field, Galapagos spreading center. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **35**: 1723–1744.

Jones, M.L. (1981) Riftia pachyptila Jones: Observations on the Vestimentiferan Worm from the Galápagos Rift. *Science* **213**: 333–336.

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

Karl, D.M. (1995) Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities. In *The Microbiology of Deep- sea Hydrothermal Vents*. D.M. Karl, New York. pp. 35–124.

Karl, D.M., Wirsen, C.O., and Jannasch, H.W. (1980) Deep-Sea Primary Production at the Galapagos Hydrothermal Vents. *Science* **207**: 1345–1347.

Katz, S., Cavanaugh, C.M., and Bright, M. (2006) Symbiosis of epi- and endocuticular bacteria with *Helicoradomenia* spp. (Mollusca, Aplacophora, Solenogastres) from deep-sea hydrothermal vents. *Mar Ecol Prog Ser* **320**: 89–99.

Kelley, D.S., Karson, J.A., Früh-Green, G.L., Yoerger, D.R., Shank, T.M., Butterfield, D.A., Hayes, J.M., Schrenk, M.O., Olson, E.J., Proskurowski, G., Jakuba, M., Bradley, A., Larson, B., Ludwig, K., Glickson, D., Buckman, K., Bradley, A.S., Brazelton, W.J., Roe, K., Elend, M.J., Delacour, A., Bernasconi, S.M., Lilley, M.D., Baross, J.A., Summons, R.E., and Sylva, S.P. (2005) A Serpentinite-Hosted Ecosystem: The Lost City Hydrothermal Field. *Science* **307**: 1428–1434.

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**: 145–149.

Kelley, J.T., Dickson, S.M., Belknap, D.F., Barnhardt, W.A., and Henderson, M. (1994) Giant sea-bed pockmarks: Evidence for gas escape from Belfast Bay, Maine. *Geology* **22**: 59.

Kelly, N., Metaxas, A., and Butterfield, D. (2007) Spatial and temporal patterns of colonization by deep-sea hydrothermal vent invertebrates on the Juan de Fuca Ridge, NE Pacific. *Aquat Biol* **1**: 1–16.

Keuning, R., Schander, C., Kongsrud, J.A., and Willassen, E. (2011) Ecology of twelve species of Thyasiridae (Mollusca: Bivalvia). *Mar Pollut Bull* **62**: 786–791.

Kirchman, D.L. (2002) The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* **39**: 91–100.

Kleiner, M., Petersen, J.M., and Dubilier, N. (2012) Convergent and divergent evolution of metabolism in sulfur-oxidizing symbionts and the role of horizontal gene transfer. *Curr Opin Microbiol* **15**: 621–631.

Krey, V., Canadell, J.G., Nakicenovic, N., Abe, Y., Andruleit, H., Archer, D., Grubler, A., Hamilton, N.T.M., Johnson, A., Kostov, V., Lamarque, J.-F., Langhorne, N., Nisbet, E.G., O'Neill, B., Riahi, K., Riedel, M., Wang, W., and Yakushev, V. (2009) Gas hydrates: entrance to a methane age or climate threat? *Environ Res Lett* **4**: 034007.

Krueger, D.M., and Cavanaugh, C.M. (1997) Phylogenetic diversity of bacterial symbionts of *Solemya* hosts based on comparative sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **63**: 91–98.

Krueger, D.M., Dubilier, N., and Cavanaugh, C.M. (1996a) Chemoautotrophic symbiosis in the tropical clam *Solemya occidentalis* (Bivalvia: Protobranchia) : ultrastructural and phylogenetic analysis. *Mar Biol* **126**: 55–64.

Krueger, D.M., Gustafson, R.G., and Cavanaugh, C.M. (1996b) Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *Biol Bull* **190**: 195–202.

Krueger, D.M., Gallager, S.M., and Cavanaugh, C.M. (1992) Suspension Feeding on Phytoplankton by *Solemya velum*, a symbiont-containing Clam. *Mar Ecol Prog Ser* **86**: 145–151.

Krylova, E.M., and Sahling, H. (2010) Vesicomyidae (Bivalvia): Current Taxonomy and Distribution. *PLoS ONE* **5**: e9957.

Kubota, N., Kanemori, M., Sasayama, Y., Aida, M., and Fukumori, Y. (2007) Identification of Endosymbionts in *Oligobrachia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida). *Microbes Environ* **22**: 136–144.

Kulm, L.D., Suess, E., Moore, J.C., Carson, B., Lewis, B.T., Ritger, S.D., Kadko, D.C., Thornburg, T.M., Embley, R.W., Rugh, W.D., Massoth, G.J., Langseth, M.G., Cochrane, G.R., and Scamman, R.L. (1986) Oregon subduction zone: venting, fauna, and carbonates. *Science* **231**: 561–566.

Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., and Hugenholtz, P. (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* **12**: 118–123.

Kutschera, U., and Niklas, K.J. (2005) Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci* **124**: 1–24.

Kuwahara, H., Yoshida, T., Takaki, Y., Shimamura, S., Nishi, S., Harada, M., Matsuyama, K., Takishita, K., Kawato, M., Uematsu, K., Fujiwara, Y., Sato, T., Kato, C., Kitagawa, M., Kato, I., and Maruyama, T. (2007) Reduced genome of the thioautotrophic intracellular symbiont in a deep-sea clam, *Calyptogena okutanii*. *Curr Biol* **17**: 881–886.

Laming, S.R., Duperron, S., Cunha, M.R., and Gaudron, S.M. (2014) Settled, symbiotic, then sexually mature: adaptive developmental anatomy in the deep-sea, chemosymbiotic mussel *Idas modiolaeformis*. *Mar Biol* **161**: 1319–1333.

Laurent, M.C.Z., Gros, O., Brulport, J.-P., Gaill, F., and Bris, N. Le (2009) Sunken wood habitat for thiotrophic symbiosis in mangrove swamps. *Mar Environ Res* **67**: 83–88.

Le Bris N, Duperron S. (2010) Chemosynthetic communities and biogeochemical energy pathways along the Mid-Atlantic Ridge: The case of *Bathymodiolus azoricus*. In:*Diversity Of Hydrothermal Systems On Slow Spreading Ocean Ridges*, Rona, PA, Devey, CW, Dyment, J, & Murton, BJ (eds), American Geophysical Union, pp. 409–429.

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

Lee, R.W., Robinson, J.J., and Cavanaugh, C.M. (1999) Pathways of inorganic nitrogen assimilation in chemoautotrophic bacteria-marine invertebrate symbioses: expression of host and symbiont glutamine synthetase. *J Exp Biol* **202**: 289–300.

Lee, R.W., Thuesen, E.V., Childress, J.J., and Fisher, C.R. (1992) Ammonium and free amino acid uptake by a deep-sea mussel (*Bathymodiolus* sp., undescribed) containing methanotrophic bacterial symbionts. *Mar Biol* **113**: 99–106.

Leschine, S.B. (1995) Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu Rev Microbiol* **49**: 399–426.

Levin, L.A. (2005) Ecology of cold seep sediments: Interactions of fauna with flow, chemistry and microbes. In *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review, Vol. 43*. Gibson, R.N., Atkinson, R.J.A., and Gordon, J.D.M. (eds). pp. 1–46.

Lewis, K.B., and Marshall, B.A. (1996) Seep faunas and other indicators of methane-rich dewatering on New Zealand convergent margins. *N Z J Geol Geophys* **39**: 181–200.

Loncke, L., Mascle, J., and Fanil Scientific Parties (2004) Mud volcanoes, gas chimneys, pockmarks and mounds in the Nile deep-sea fan (Eastern Mediterranean): geophysical evidences. *Mar Pet Geol* **21**: 669–689.

Lorion, J., Kiel, S., Faure, B., Kawato, M., Ho, S.Y.W., Marshall, B., Tsuchida, S., Miyazaki, J.-I., and Fujiwara, Y. (2013) Adaptive radiation of chemosymbiotic deep-sea mussels. *Proc R Soc B Biol Sci* **280**: 20131243.

Lorion, J., Halary, S., Nascimento, J. do, Samadi, S., Couloux, A., and Duperron, S. (2012) Evolutionary history of *Idas* sp. Med (Bivalvia: Mytilidae), a cold seep mussel bearing multiple symbionts. *Cah Biol Mar* **53**: 77–87.

Lorion, J., Buge, B., Cruaud, C., and Samadi, S. (2010) New insights into diversity and evolution of deep-sea Mytilidae (Mollusca: Bivalvia). *Mol Phylogenet Evol* **57**: 71–83.

Lorion, J., Duperron, S., Gros, O., Cruaud, C., and Samadi, S. (2009) Several deep-sea mussels and their associated symbionts are able to live both on wood and on whale falls. *Proc R Soc B-Biol Sci* **276**: 177–185.

Lösekann, T., Robador, A., Niemann, H., Knittel, K., Boetius, A., and Dubilier, N. (2008) Endosymbioses between bacteria and deep-sea siboglinid tubeworms from an Arctic Cold Seep (Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea). *Environ Microbiol* **10**: 3237–3254.

Lozupone, C.A., and Knight, R. (2007) Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 11436–11440.

Lutz, R.A., Jablonski, D., and Turner, R.D. (1984) Larval Development and Dispersal at Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Science* **226**: 1451–1454.

MacDonald, I.R., Sager, W.W., and Peccini, M.B. (2003) Gas hydrate and chemosynthetic biota in mounded bathymetry at mid-slope hydrocarbon seeps: Northern Gulf of Mexico. *Mar Geol* **198**: 133–158.

MacDonald, I.R., Buthman, D.B., Sager, W.W., Peccini, M.B., and Guinasso, N.L. (2000) Pulsed oil discharge from a mud volcano. *Geology* **28**: 907–910.

MacDonald, I.R., Guinasso, N.L., Sassen, R., Brooks, J.M., Lee, L., and Scott, K.T. (1994) Gas hydrate that breaches the sea floor on the continental slope of the Gulf of Mexico. *Geology* **22**: 699–702.

MacDonald, I.R., Jr, N.L.G., Reilly, J.F., Brooks, J.M., Callender, W.R., and Gabrielle, S.G. (1990) Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities: VI. Patterns in community structure and habitat. *Geo-Mar Lett* **10**: 244–252.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., and Rothberg, J.M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376–380.

Margulis, L. (1970) *Origin of Eukaryotic Cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the precambrian earth*. Yale University Press, New Haven.

Markert, S., Arndt, C., Felbeck, H., Becher, D., Sievert, S.M., Hügler, M., Albrecht, D., Robidart, J., Bench, S., Feldman, R.A., Hecker, M., and Schweder, T. (2007) Physiological Proteomics of the Uncultured Endosymbiont of *Riftia pachyptila*. *Science* **315**: 247–250.

Martin, J.B., Kastner, M., Henry, P., Pichon, X. Le, and Lallement, S. (1996) Chemical and isotopic evidence for sources of fluids in a mud volcano field seaward of the Barbados accretionary wedge. *J Geophys Res Solid Earth* **101**: 20325–20345.

Masuzawa, T., Handa, N., Kitagawa, H., and Kusakabe, M. (1992) Sulfate reduction using methane in sediments beneath a bathyal “cold seep” giant clam community off Hatsushima Island, Sagami Bay, Japan. *Earth Planet Sci Lett* **110**: 39–50.

McCutcheon, J.P., and Moran, N.A. (2012) Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **10**: 13–26.

McFall-Ngai, M.J. (2000) Negotiations between animals and bacteria: the “diplomacy” of the squid-vibrio symbiosis. *Comp Biochem Physiol -Mol Integr Physiol* **126**: 471–480.

Moran, N.A., and Wernegreen, J.J. (2000) Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends Ecol Evol* **15**: 321–326.

Moran, N.A. (1996) Accelerated evolution and Muller’s rachet in endosymbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2873–2878.

Moran, N.A., Munson, M.A., Baumann, P., and Ishikawa, H. (1993) A Molecular Clock in Endosymbiotic Bacteria is Calibrated Using the Insect Hosts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **253**: 167–171.

Mullineaux, L.S., Mills, S.W., and Goldman, E. (1998) Recruitment variation during a pilot colonization study of hydrothermal vents (9°50′N, East Pacific Rise). *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* **45**: 441–464.

Nakagawa, S., and Takai, K. (2008) Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 1–14.

Nakajima, H., Hongoh, Y., Usami, R., Kudo, T., and Ohkuma, M. (2005) Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and the bacterial community colonizing the gut epithelium. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 247–255.

Nemergut, D.R., Costello, E.K., Hamady, M., Lozupone, C., Jiang, L., Schmidt, S.K., Fierer, N., Townsend, A.R., Cleveland, C.C., Stanish, L., and Knight, R. (2011) Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ Microbiol* **13**: 135–144.

Newton, I.L.G., Girguis, P.R., and Cavanaugh, C.M. (2008) Comparative genomics of vesicomyid clam (Bivalvia: Mollusca) chemosynthetic symbionts. *BMC Genomics* **9**: 585.

Newton, I.L.G., Woyke, T., Auchtung, T.A., Dilly, G.F., Dutton, R.J., Fisher, M.C., Fontanez, K.M., Lau, E., Stewart, F.J., Richardson, P.M., Barry, K.W., Saunders, E., Detter, J.C., Wu, D., Eisen, J.A., and Cavanaugh, C.M. (2007) The *Calyptogena magnifica* chemoautotrophic symbiont genome. *Science* **315**: 998–1000.

Normark, W., Murray, J., Lupton, J., Delaney, J., Johnson, H., Koski, R., Clague, D., and Morton, J. (1982) Polymetallic Sulfide Deposits and Water-Column of Active Hydrothermal Vents on the Southern Juan-De-Fuca Ridge. *Mar Technol Soc J* **16**: 46–53.

Nussbaumer, A.D., Fisher, C.R., and Bright, M. (2006) Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* **441**: 345–348.

Nussbaumer, A.D., Bright, M., Baranyi, C., Beisser, C.J., and Ott, J.A. (2004) Attachment mechanism in a highly specific association between ectosymbiotic bacteria and marine nematodes. *Aquat Microb Ecol* **34**: 239–246.

O'Mullan, G.D., Maas, P.A., Lutz, R.A., and Vrijenhoek, R.C. (2001) A hybrid zone between hydrothermal vent mussels (Bivalvia: Mytilidae) from the Mid-Atlantic Ridge. *Mol Ecol* **10**: 2819–2831.

Oldroyd, G.E.D. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252–263.

Oliver, G., Rodrigues, C., and Cunha, M.R. (2011) Chemosymbiotic bivalves from the mud volcanoes of the Gulf of Cadiz, NE Atlantic, with descriptions of new species of Solemyidae, Lucinidae and Vesicomyidae. *ZooKeys* **113**: 1.

Olu, K., Cordes, E.E., Fisher, C.R., Brooks, J.M., Sibuet, M., and Desbruyères, D. (2010) Biogeography and Potential Exchanges Among the Atlantic Equatorial Belt Cold-Seep Faunas. *PLoS ONE* **5**: e11967.

Olu, K., Lance, S., Sibuet, M., Henry, P., Fiala-Médioni, A., and Dinet, A. (1997) Cold seep communities as indicators of fluid expulsion patterns through mud volcanoes seaward of the Barbados accretionary prism. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **44**: 811–841.

Olu-Le Roy, K., Cosel, R. von, Hourdez, S., Carney, S.L., and Jollivet, D. (2007a) Amphi-Atlantic cold-seep *Bathymodiolus* species complexes across the equatorial belt. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **54**: 1890–1911.

Olu-Le Roy, K., Caprais, J.-C., Fifis, A., Fabri, M.-C., Galéron, J., Budzinsky, H., Ménach, K. Le, Khripounoff, A., Ondréas, H., and Sibuet, M. (2007b) Cold-seep assemblages on a giant pockmark off West Africa: spatial patterns and environmental control. *Mar Ecol* **28**: 115–130.

Olu-Le Roy, K., Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Gofas, S., Salas, C., Mariotti, A., Foucher, J.-P., and Woodside, J. (2004) Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: composition, symbiosis and spatial distribution on mud volcanoes. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **51**: 1915–1936.

Ott, J., Bright, M., and Bulgheresi, S. (2004) Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria. *Symbiosis* **36**: 103–126.

Pailleret, M., Haga, T., Petit, P., Prive-Gill, C., Saedlou, N., Gaill, F., and Zbinden, M. (2007) Sunken wood from the Vanuatu Islands: identification of wood substrates and preliminary description of associated fauna. *Mar Ecol- Evol Perspect* **28**: 233–241.

Palacios, C., Zbinden, M., Pailleret, M., Gaill, F., and Lebaron, P. (2009) Highly Similar Prokaryotic Communities of Sunken Wood at Shallow and Deep-Sea Sites Across the Oceans. *Microb Ecol* **58**: 737–752.

Paull, C.K., Hecker, B., Commeau, R., Freeman-Lynde, R.P., Neumann, C., Corso, W.P., Golubic, S., Hook, J.E., Sikes, E., and Curray, J. (1984) Biological Communities at the Florida Escarpment Resemble Hydrothermal Vent Taxa. *Science* **226**: 965–967.

Peek, A.S., Vrijenhoek, R.C., and Gaut, B.S. (1998a) Accelerated evolutionary rate in sulfur-oxidizing endosymbiotic bacteria associated with the mode of symbiont transmission. *Mol Biol Evol* **15**: 1514–1523.

Peek, A.S., Feldman, R.A., Lutz, R.A., and Vrijenhoek, R.C. (1998b) Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9962–9966.

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**: 3094–3101.

Petersen, J.M., Wentrup, C., Verna, C., Knittel, K., and Dubilier, N. (2012) Origins and evolutionary flexibility of chemosynthetic symbionts from deep-sea animals. *Biol Bull* **223**: 123–137.

Petersen, J.M., Zielinski, F.U., Pape, T., Seifert, R., Moraru, C., Amann, R., Hourdez, S., Girguis, P.R., Wankel, S.D., Barbe, V., Pelletier, E., Fink, D., Borowski, C., Bach, W., and Dubilier, N. (2011) Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* **476**: 176–180.

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

Petersen, J.M., and Dubilier, N. (2009) Methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Environ Microbiol Rep* **1**: 319–335.

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

Ponsard, J., Cambon-Bonavita, M.-A., Zbinden, M., Lepoint, G., Joassin, A., Corbari, L., Shillito, B., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., and Compère, P. (2013) Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J* **7**: 96–109.

Pradillon, F., Zbinden, M., Bris, N. Le, Hourdez, S., Barnay, A.-S., and Gaill, F. (2009) Development of assemblages associated with alvinellid colonies on the walls of high-temperature vents at the East Pacific Rise. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* **56**: 1622–1631.

Pradillon, F., Schmidt, A., Peplies, J., and Dubilier, N. (2007) Species identification of marine invertebrate early stages by whole-larvae *in situ* hybridisation of 18S ribosomal RNA. *Mar Ecol Prog Ser* **333**: 103–116.

Pradillon, F., Zbinden, M., Mullineaux, L., and Gaill, F. (2005) Colonisation of newly-opened habitat by a pioneer species, *Alvinella pompejana* (Polychaeta: Alvinellidae), at East Pacific Rise vent sites. *Mar Ecol Prog Ser* **302**: 147–157.

Prosser, J.I. (2010) Replicate or lie. *Environ Microbiol* **12**: 1806–1810.

Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R.J., and Turnbaugh, P.J. (2011) Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *BMC Bioinformatics* **12**: 38.

Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T.P., Davenport, R.J., Hall, N., Head, I.M., Read, L.F., and Sloan, W.T. (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Methods* **6**: 639–641.

Rad, U. von, Berner, U., Delisle, G., Doose-Rolinski, H., Fechner, N., Linke, P., Lückge, A., Roeser, H.A., Schmaljohann, R., Wiedicke, M., Parties, S. 122/130 S., Block, M., Damm, V., Erbacher, J., Fritsch, J., Harazim, B., Poggenburg, J., Scheeder, G., Schreckenberger, B., Mirbach, N. von, Drews, M., Walter, S., Khan, A.A., Inam, A., Tahir, M., Tabrez, A.R., Cheema, A.H., Pervaz, M., and Ashraf, M. (2000) Gas and fluid venting at the Makran accretionary wedge off Pakistan. *Geo-Mar Lett* **20**: 10–19.

Ramette, A., and Tiedje, J.M. (2007) Biogeography: An Emerging Cornerstone for Understanding Prokaryotic Diversity, Ecology, and Evolution. *Microb Ecol* **53**: 197–207.

Ramirez-Llodra, E., Shank, T., and German, C. (2007) Biodiversity and Biogeography of Hydrothermal Vent Species: Thirty Years of Discovery and Investigations. *Oceanography* **20**: 30–41.

Rau, G.H. (1981) Hydrothermal Vent Clam and Tube Worm 13C/12C: Further Evidence of Nonphotosynthetic Food Sources. *Science* **213**: 338–340.

Reid, W.D.K., Sweeting, C.J., Wigham, B.D., Zwirglmaier, K., Hawkes, J.A., McGill, R.A.R., Linse, K., and Polunin, N.V.C. (2013) Spatial Differences in East Scotia Ridge Hydrothermal Vent Food Webs: Influences of Chemistry, Microbiology and Predation on Trophodynamics. *PLoS ONE* **8**: e65553.

Rhijn, P. van, and Vanderleyden, J. (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**: 124–142.

Riou, V., Duperron, S., Halary, S., Dehairs, F., Bouillon, S., Martins, I., Colaço, A., and Serrão Santos, R. (2010) Variation in physiological indicators in *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae) at the Menez Gwen Mid-Atlantic Ridge deep-sea hydrothermal vent site within a year. *Mar Environ Res* **70**: 264–271.

Riou, V., Halary, S., Duperron, S., Bouillon, S., Elskens, M., Bettencourt, R., Santos, R.S., Dehairs, F., and Colaço, A. (2008) Influence of CH_4 and H_2S availability on symbiont distribution, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences* **5**: 1681–1691.

Robidart, J.C., Bench, S.R., Feldman, R.A., Novoradovsky, A., Podell, S.B., Gaasterland, T., Allen, E.E., and Felbeck, H. (2008) Metabolic versatility of the *Riftia pachyptila* endosymbiont revealed through metagenomics. *Environ Microbiol* **10**: 727–737.

Rodrigues, C.F., Cunha, M.R., Génio, L., and Duperron, S. (2013) A complex picture of associations between two host mussels and symbiotic bacteria in the Northeast Atlantic. *Naturwissenschaften* **100**: 21–31.

Rodrigues, C.F., Duperron, S., and Gaudron, S.M. (2011) First documented record of a living solemyid bivalve in a pockmark of the Nile Deep-sea Fan (eastern Mediterranean Sea). *Mar Biodivers Rec* **4**: null–null.

Rodrigues, C.F., and Duperron, S. (2011) Distinct symbiont lineages in three thyasirid species (Bivalvia: Thyasiridae) from the eastern Atlantic and Mediterranean Sea. *Naturwissenschaften* **98**: 281–287.

Roeselers, G., and Newton, I.L.G. (2012) On the evolutionary ecology of symbioses between chemosynthetic bacteria and bivalves. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**: 1–10.

Romano, C., Voight, J.R., Company, J.B., Plyuscheva, M., and Martin, D. (2013) Submarine canyons as the preferred habitat for wood-boring species of Xylophaga (Mollusca, Bivalvia). *Prog Oceanogr* **118**: 175–187.

Rona, P.A., Klinkhammer, G., Nelsen, T.A., Trefry, J.H., and Elderfield, H. (1986) Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge. *Nature* **321**: 33–37.

Rouse, G.W., Goffredi, S.K., and Vrijenhoek, R.C. (2004) *Osedax*: Bone-Eating Marine Worms with Dwarf Males. *Science* **305**: 668–671.

Ruehland, C., Blazejak, A., Lott, C., Loy, A., Erséus, C., and Dubilier, N. (2008) Multiple bacterial symbionts in two species of co-occurring gutless oligochaete worms from Mediterranean sea grass sediments. *Environ Microbiol* **10**: 3404–3416.

Rymaszewska, A. (2007) Symbiotic bacteria in oocyte and ovarian cell mitochondria of the tick *Ixodes ricinus*: biology and phylogenetic position. *Parasitol Res* **100**: 917–920.

Sacchi, L., Bigliardi, E., Corona, S., Beninati, T., Lo, N., and Franceschi, A. (2004) A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue Cell* **36**: 43–53.

Sagan, L. (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* **14**: 255–274.

Sager, W.W., MacDonald, I.R., and Hou, R. (2003) Geophysical signatures of mud mounds at hydrocarbon seeps on the Louisiana continental slope, northern Gulf of Mexico. *Mar Geol* **198**: 97–132.

Sassen, R., Roberts, H.H., Carney, R., Milkov, A.V., DeFreitas, D.A., Lanoil, B., and Zhang, C. (2004) Free hydrocarbon gas, gas hydrate, and authigenic minerals in chemosynthetic communities of the northern Gulf of Mexico continental slope: relation to microbial processes. *Chem Geol* **205**: 195–217.

Sassen, R., Brooks, J.M., MacDonald, I.R., Ii, M.C.K., Guinasso, N.L., Jr, and Requejo, A.G. (1993) Association of Oil Seeps and Chemosynthetic Communities with Oil Discoveries, Upper Continental Slope, Gulf of Mexico. *Gulf Coast Assoc Geol Soc Trans* **43**: 349–355.

Schloss, P.D., Gevers, D., and Westcott, S.L. (2011) Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS One* **6**: e27310.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Horn, D.J. Van, and Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537–7541.

Segonzac, M., Saint-Laurent, M. De, 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.

Shank, T.M., Fornari, D.J., Damm, K.L. Von, Lilley, M.D., Haymon, R.M., and Lutz, R.A. (1998) Temporal and spatial patterns of biological community development at nascent deep-sea hydrothermal vents (9°50′N, East Pacific Rise). *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* **45**: 465–515.

Shillito, B., Gaill, F., and Ravaux, J. (2014) The Ipocamp Pressure Incubator for Deep-Sea Fauna. *J Mar Sci Technol-Taiwan* **22**: 97–102.

Shillito, B., Hamel, G., Duchi, C., Cottin, D., Sarrazin, J., Sarradin, P.-M., Ravaux, J., and Gaill, F. (2008) Live capture of megafauna from 2300 m depth, using a newly designed Pressurized Recovery Device. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **55**: 881–889.

Sibuet, M., and Olu-Le Roy, K. (2002) Cold Seep Communities on Continental Margins: Structure and Quantitative Distribution Relative to Geological and Fluid Venting Patterns. In *Ocean Margin Systems*. Wefer, P.D.G., Billett, D.D., Hebbeln, D.D., Jørgensen, P.D.B.B., Schlüter, P.D.M., and Weering, D.T.C.E. van (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 235–251.

Sibuet, M., and Olu, K. (1998) Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* **45**: 517–567.

Siegl, A., Kamke, J., Hochmuth, T., Piel, J., Richter, M., Liang, C., Dandekar, T., and Hentschel, U. (2011) Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. *ISME J* **5**: 61–70.

Simoneit, B.R.T., Lonsdale, P.F., Edmond, J.M., and Shanks III, W.C. (1990) Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Appl Geochem* **5**: 41–49.

Smith, C.R. (2006) Bigger is better: the role of whales as detritus in marine ecosystems. In *Whales, whaling and ocean ecosystems*. Estes J, DeMaster DP, Doak DF, Williams TM, Brownell RL Jr, Berkeley, CA. pp. 286–302.

Smith, C.R., and Baco, A.R. (2003) Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanogr Mar Biol* **41**: 311–354.

Smith, C.R., Maybaum, H.L., Baco, A.R., Pope, R.H., Carpenter, S.D., Yager, P.L., Macko, S.A., and Deming, J.W. (1998) Sediment community structure around a whale skeleton in the deep Northeast Pacific: Macrofaunal, microbial and bioturbation effects. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* **45**: 335–364.

Smith, C.R., Kukert, H., Wheatcroft, R.A., Jumars, P.A., and Deming, J.W. (1989) Vent fauna on whale remains. *Nature* **341**: 27–28.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., 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 U S A* **103**: 12115–12120.

Stahl, D., Lane, D., Olsen, G., and Pace, N. (1984) Analysis of Hydrothermal Vent-Associated Symbionts by Ribosomal-Rna Sequences. *Science* **224**: 409–411.

Stewart, F.J., Young, C.R., and Cavanaugh, C.M. (2009) Evidence for homologous recombination in intracellular chemosynthetic clam symbionts. *Mol Biol Evol* **26**: 1391–1404.

Stewart, F.J., and Cavanaugh, C.M. (2009) Pyrosequencing analysis of endosymbiont population structure: co-occurrence of divergent symbiont lineages in a single vesicomyid host clam. *Environ Microbiol* **11**: 2136–2147.

Stewart, F.J., Young, C.R., and Cavanaugh, C.M. (2008) Lateral symbiont acquisition in a maternally transmitted chemosynthetic clam endosymbiosis. *Mol Biol Evol* **25**: 673–687.

Stewart, F.J., Newton, I.L.G., and Cavanaugh, C.M. (2005) Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic–anoxic interfaces. *Trends Microbiol* **13**: 439–448.

Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J., and Hurst, G.D.D. (1999) *Wolbachia pipientis*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annu Rev Microbiol* **53**: 71–102.

Suess, E., Bohrmann, G., Greinert, J., and Lausch, E. (1999) Flammable Ice. *Sci Am* **281**: 76–83.

Suzuki, Y., Kojima, S., Watanabe, H., Suzuki, M., Tsuchida, S., Nunoura, T., Hirayama, H., Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2006) Single host and symbiont lineages of hydrothermal-vent gastropods *Ifremeria nautilei* (Provannidae) : biogeography and evolution. *Mar Ecol Prog Ser* **315**: 167–175.

Suzuki, Y., Sasaki, T., Suzuki, M., Nogi, Y., Miwa, T., Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2005a) Novel chemoautotrophic endosymbiosis between a member of the

Epsilonproteobacteria and the hydrothermal-vent gastropod *Alviniconcha* aff. *hessleri* (Gastropoda: Provannidae) from the Indian Ocean. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5440–5450.

Suzuki, Y., Sasaki, T., Suzuki, M., Tsuchida, S., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2005b) Molecular phylogenetic and isotopic evidence of two lineages of chemoautotrophic endosymbionts distinct at the subdivision level harbored in one host-animal type: the genus *Alviniconcha* (Gastropoda: Provannidae). *FEMS Microbiol Lett* **249**: 105–112.

Szafranski, K.M., Gaudron, S.M., and Duperron, S. (2014) Direct evidence for maternal inheritance of bacterial symbionts in small deep-sea clams (Bivalvia: Vesicomyidae). *Naturwissenschaften* **101**: 373–383.

Takai, K., Campbell, B.J., Cary, S.C., Suzuki, M., Oida, H., Nunoura, T., Hirayama, H., Nakagawa, S., Suzuki, Y., Inagaki, F., and Horikoshi, K. (2005) Enzymatic and Genetic Characterization of Carbon and Energy Metabolisms by Deep-Sea Hydrothermal Chemolithoautotrophic Isolates of Epsilonproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7310–7320.

Taylor, C.D., Wirsen, C.O., and Gaill, F. (1999) Rapid Microbial Production of Filamentous Sulfur Mats at Hydrothermal Vents. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2253–2255.

Taylor, J.D., Williams, S.T., and Glover, E.A. (2007) Evolutionary relationships of the bivalve family Thyasiridae (Mollusca: Bivalvia), monophyly and superfamily status. *J Mar Biol Assoc U K* **87**: 565–574.

Taylor, J.D., and Glover, E.A. (2006) Lucinidae (Bivalvia) – the most diverse group of chemosymbiotic molluscs. *Zool J Linn Soc* **148**: 421–438.

Thornhill, D.J., Wiley, A.A., Campbell, A.L., Bartol, F.F., Teske, A., and Halanych, K.M. (2008) Endosymbionts of *Siboglinum fiordicum* and the phylogeny of bacterial endosymbionts in Siboglinidae (Annelida). *Biol Bull* **214**: 135–144.

Thurber, A.R., Jones, W.J., and Schnabel, K. (2011) Dancing for Food in the Deep Sea: Bacterial Farming by a New Species of Yeti Crab. *PLoS ONE* **6**: e26243.

Tivey, M. (2007) Generation of Seafloor Hydrothermal Vent Fluids and Associated Mineral Deposits. *Oceanography* **20**: 50–65.

Tivey, M. (2004) The Remarkable Diversity of Seafloor Vents. *Ocean Mag* **42**: 1–6.

Tivey, M., Humphris, S., Thompson, G., Hannington, M., and Rona, P. (1995) Deducing Patterns of Fluid-Flow and Mixing Within the Tag Active Hydrothermal Mound Using Mineralogical and Geochemical Data. *J Geophys Res-Solid Earth* **100**: 12527–12555.

Tivey, M.K., Stakes, D.S., Cook, T.L., Hannington, M.D., and Petersen, S. (1999) A model for growth of steep-sided vent structures on the Endeavour Segment of the Juan de Fuca Ridge: Results of a petrologic and geochemical study. *J Geophys Res Solid Earth* **104**: 22859–22883.

Trask, J.L., and Dover, C.L. Van (1999) Site-specific and ontogenetic variations in nutrition of mussels (Bathymodiolus sp.) from the Lucky Strike hydrothermal vent field, Mid-Atlantic Ridge. *Limnol Oceanogr* **44**: 334–343.

Treude, T., Smith, C.R., Wenzhfer, F., Carney, E., Bernardino, A.F., Hannides, A.K., Krger, M., and Boetius, A. (2009) Biogeochemistry of a deep-sea whale fall: sulfate reduction, sulfide efflux and methanogenesis. *Mar Ecol Prog Ser* **382**: 1–21.

Tunnicliffe, V., Juniper, S.K., and Sibuet, M. (2003) Reducing environments of the deep-sea floor. In *Ecosystems of the World: The Deep Sea*. P.A. Tyler, pp. 81–110.

Tunnicliffe, V., Botros, M., Burgh, M.E. De, Dinet, A., Johnson, H.P., Juniper, S.K., and McDuff, R.E. (1986) Hydrothermal vents of Explorer Ridge, northeast Pacific. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **33**: 401–412.

Turner, R.D. (1973) Wood-Boring Bivalves, Opportunistic Species in the Deep Sea. *Science* **180**: 1377–1379.

Tyler, P.A., and Young, C.M. (2003) Dispersal at hydrothermal vents: a summary of recent progress. *Hydrobiol Hydrobiol* **503**: 9–19.

Tyler, P.A., German, C.R., Ramirez-Llodra, E., and Dover, C.L. Van (2002) Understanding the biogeography of chemosynthetic ecosystems. *Oceanol Acta* **25**: 227–241.

Urakawa, H., Dubilier, N., Fujiwara, Y., Cunningham, D.E., Kojima, S., and Stahl, D.A. (2005) Hydrothermal vent gastropods from the same family (Provannidae) harbour ε- and γ-proteobacterial endosymbionts. *Environ Microbiol* **7**: 750–754.

Verna, C., Ramette, A., Wiklund, H., Dahlgren, T.G., Glover, A.G., Gaill, F., and Dubilier, N. (2010) High symbiont diversity in the bone-eating worm *Osedax mucofloris* from shallow whale-falls in the North Atlantic. *Environ Microbiol* **12**: 2355–2370.

Vogt, P.R., Gardner, J., and Crane, K. (1999) The Norwegian–Barents–Svalbard (NBS) continental margin: Introducing a natural laboratory of mass wasting, hydrates, and ascent of sediment, pore water, and methane. *Geo-Mar Lett* **19**: 2–21.

Vrijenhoek, R.C. (2010) Genetic diversity and connectivity of deep-sea hydrothermal vent metapopulations. *Mol Ecol* **19**: 4391–4411.

Wentrup, C., Wendeberg, A., Huang, J.Y., Borowski, C., and Dubilier, N. (2013) Shift from widespread symbiont infection of host tissues to specific colonization of gills in juvenile deep-sea mussels. *ISME J* .

Wit, R. De, and Bouvier, T. (2006) "Everything is everywhere, but, the environment selects"; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ Microbiol* **8**: 755–758.

Wolff, T. (2005) Composition and endemism of the deep-sea hydrothermal vent fauna. *Biol Mar* **46**: 97–104.

Wolff, T. (1979) Macrofaunal Utilization of Plant Remains in the Deep-Sea. *Sarsia* **64**: 117–136.

Won, Y.J., Jones, W.J., and Vrijenhoek, R.C. (2008) Absence of cospeciation between deep-sea Mytilids and their thiotrophic endosymbionts. *J Shellfish Res* **27**: 129–138.

Won, Y.J., Hallam, S.J., O'Mullan, G.D., Pan, I.L., Buck, K.R., and Vrijenhoek, R.C. (2003) Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6785–6792.

Woyke, T., Tighe, D., Mavromatis, K., Clum, A., Copeland, A., Schackwitz, W., Lapidus, A., Wu, D., McCutcheon, J.P., McDonald, B.R., Moran, N.A., Bristow, J., and Cheng, J.-F. (2010) One Bacterial Cell, One Complete Genome. *Plos One* **5**.

Woyke, T., Xie, G., Copeland, A., González, J.M., Han, C., Kiss, H., Saw, J.H., Senin, P., Yang, C., Chatterji, S., Cheng, J.-F., Eisen, J.A., Sieracki, M.E., and Stepanauskas, R. (2009) Assembling the Marine Metagenome, One Cell at a Time. *PLoS ONE* **4**: e5299.

Woyke, T., Teeling, H., Ivanova, N.N., Huntemann, M., Richter, M., Gloeckner, F.O., Boffelli, D., Anderson, I.J., Barry, K.W., Shapiro, H.J., Szeto, E., Kyrpides, N.C., Mussmann, M., Amann, R., Bergin, C., Ruehland, C., Rubin, E.M., and Dubilier, N. (2006) Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* **443**: 950–955.

Yamamura, N. (1996) Evolution of mutualistic symbiosis: A differential equation model. *Res Popul Ecol* **38**: 211–218.

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

Zhu, D., Tanabe, S.-H., Yang, C., Zhang, W., and Sun, J. (2013) Bacterial Community Composition of South China Sea Sediments through Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *Plos One* **8**: e78501.

Zinger, L., Amaral-Zettler, L.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M., Welch, D.B.M., Martiny, J.B.H., Sogin, M., Boetius, A., and Ramette, A. (2011) Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. *PLoS ONE* **6**: e24570.

Zook, D. (1998) A new symbiosis language. *ISS Symbiosis News* **1**: 1–3.

Annexes

Annexe 1 Article scientifique 4 « Diversity of symbioses between chemosynthetic bacteria and metazoans at the Guiness cold seep site (Gulf of Guinea, West Africa) »

Cet article scientifique a été publié dans le journal scientifique « MicrobiologyOpen » volume 1, numéro 4 en décembre 2012. J'ai eu l'occasion de contribuer à cet article en effectuant les expériences du FISH et les acquisitions d'images au microscope à fluorescence, ce qui m'a permis d'améliorer mes compétences dans la microscopie.

MicrobiologyOpen

Open Access

Diversity of symbioses between chemosynthetic bacteria and metazoans at the Guiness cold seep site (Gulf of Guinea, West Africa)

Sébastien Duperron[1], Clara F. Rodrigues[1,2], Nelly Léger[1], Kamil Szafranski[1], Carole Decker[3], Karine Olu[3] & Sylvie M. Gaudron[1]

[1]UMR 7138 (UPMC CNRS IRD MNHN), Systématique, Adaptation, Evolution, Université Pierre et Marie Curie, 7, quai St. Bernard, bâtiment A, 75005, Paris, France
[2]Departamento de Biologia and CESAM, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal
[3]Laboratoire Environnement Profond, Département Etudes des Ecosystèmes Profonds, Centre Ifremer de Brest, BP 71, 29280, Plouzané, France

Keywords
Acharax, *Calyptogena*, chemosynthesis, cold seeps, *Elenaconcha*, Gulf of Guinea, *Lamellibrachia*, symbiosis, *Thyasira*

Correspondence
Sébastien Duperron, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7138 (UPMC CNRS IRD MNHN), Systématique, Adaptation, Evolution, 7, quai St. Bernard, bâtiment A, 75005 Paris, France. Tel: 0033(1)44-27-39-95; Fax: 0033 (1)44-27-58-01; E-mail: sebastien.duperron@snv.jussieu.fr

Funding Information
Cruise and experiments were funded by UPMC, CNRS, and grants from ANR DeepOases, GDR Ecchis. Researchers were funded by FCT (C. R. postdoctoral grant), Marie Curie Actions ITN SYMBIOMICS (K. S. doctoral grant), and Ifremer (C. D. postdoctoral grant).

Received: 31 July 2012; Revised: 10 October 2012; Accepted: 15 October 2012

doi: 10.1002/mbo3.47

Abstract

Fauna from deep-sea cold seeps worldwide is dominated by chemosymbiotic metazoans. Recently, investigation of new sites in the Gulf of Guinea yielded numerous new species for which symbiosis was strongly suspected. In this study, symbioses are characterized in five seep-specialist metazoans recently collected from the Guiness site located at ~600 m depth. Four bivalve and one annelid species belonging to families previously documented to harbor chemosynthetic bacteria were investigated using bacterial marker gene sequencing, fluorescence in situ hybridization, and stable isotope analyses. Results support that all five species display chemosynthetic, sulfur-oxidizing γ-proteobacteria. Bacteria are abundant in the gills of bivalves, and in the trophosome of the siboglinid annelid. As observed for their relatives occurring at deeper sites, chemoautotrophy is a major source of carbon for animal nutrition. Although symbionts found in each host species are related to symbionts found in other metazoans from the same families, several incongruencies are observed among phylogenetic trees obtained from the different bacterial genes, suggesting a certain level of heterogeneity in symbiont strains present. Results provide new insights into the diversity, biogeography, and role of symbiotic bacteria in metazoans from the Gulf of Guinea, at a site located at an intermediate depth between the continental shelf and the deep sea.

Introduction

Symbioses between chemosynthetic bacteria and metazoans are responsible for the high animal biomasses encountered at hydrothermal vents and cold seeps in the deep sea, because bacteria convert monocarbon compounds such as methane or dissolved inorganic carbon into complex organic molecules available to their hosts (Stewart et al. 2005; Dubilier et al. 2008). The importance of symbiosis is particularly evident when looking at huge biomasses reached by symbionts-associated metazoans flourishing around vents in the east Pacific Rise or at certain seep sites in the Gulf of Mexico (Van Dover 2000). Many other vent and seep sites around the world are less spectacular, and display much lower biomasses, but the fauna at these sites is still dominated by symbiont-associated animals, as seen at seeps in the eastern Mediterranean, Gulf of Cadiz, Norwegian, or Marmara Sea (Olu-LeRoy et al. 2004). At very shallow sites, however, this particular fauna is absent and replaced by animals deriving their carbon from photosynthetic primary production, with a limit approximately situated at 200 m depth for vents (Tarasov et al. 2005; Dando 2010). Shelf seeps are inhabited by a subset of typical shelf fauna,

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

which includes the sulfide-tolerant species, and typical seep groups are often absent or rare, both in terms of biomass and species number (Levin et al. 2000). Chemosymbiotic species present at shallow sites are not the typical vent or seep-specialists, apart from a few exceptions such as the vent obligate *Siboglinum* (Bay of Plenty, New Zealand, 25–45 m depth), and one large *Bathymodiolus* at 154 m (Makauley Cone, Kermadec Ridge) (Smith et al. 2004; Dando 2010). Vent- and seep-specialist chemosymbiotic metazoans are more significant in the transition zone between the shelf and the deep sea. In the Gulf of Mexico, 37% of the species identified at various seep sites ranging from 400 to 1000 m on the Louisiana slope harbored symbionts (Sibuet and Olu 1998). At these depths, symbiotic nutrition can be mixed with assimilation of photosynthesis-derived carbon, as demonstrated in the symbiont-bearing mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Menez Gwen site (800 m deep on the Mid-Atlantic Ridge), which obtain part of their nutrition from heterotrophy, and not only from their symbionts (Riou et al. 2010). Besides, many groups of deep-sea chemosymbiotic organisms are supposedly derived from shallow-water ancestors (Distel et al. 2000). Sites situated in the transition zone between shelf and deep sea are thus of particular interest to understand the relative importance of symbiotic versus heterotrophic nutrition, and how seep- and vent-specialist faunas with their bacterial partners have evolved.

Research on cold seeps in the Gulf of Guinea is linked to the existence of important hydrocarbon reservoirs. Initial studies focused on geophysical aspects, followed by a more biology-oriented program which benefited from several cruises. Along with taxonomic identification of organisms (Andersen et al. 2004; von Cosel and Olu 2009), a major concern was the assessment of deep-sea drilling impact (Jorissen et al. 2009). Most of the work focused on the deep site Regab, a giant pockmark located 3150 m deep on the Gabon margin, due to its biological richness (Olu-LeRoy et al. 2007a,b; Cambon-Bonavita et al. 2009; von Cosel and Olu 2009). Yet, only a few molecular studies investigated organisms and their associated symbionts at Regab (Duperron et al. 2005; Cambon-Bonavita et al. 2009; Rodrigues and Duperron 2011). The shallower Guiness site was discovered 490 km north of Regab, at depths between 580 and 670 m, but was not explored in detail (von Cosel and Olu 2009). Fauna at Guiness is composed mostly of vagrant metazoans such as crabs, holothurians, anemones, and various fishes, which likely rely on photosynthesis-derived organic matter. Seep specialists such as vesicomyid clams and siboglinid tubeworms are also present, in lower abundances, associated with carbonates and localized patches of dark sediment often covered by white microbial mats (Fig. S1F and H, pers. obs.). Large numbers of empty bivalve shells are seen. During the 2011 WACS ("West African Cold Seeps") cruise, several metazoans from groups known to live in symbiosis with bacteria were sampled at Guiness, for which no data were previously available. Faunal similarities exist between Gulf of Guinea and Gulf of Mexico cold seeps, and it is hypothesized that a colonization route exists along the Atlantic Equatorial Belt. Documenting organisms and symbioses in the Gulf of Guinea at several depths is thus of major interest if we are to understand the biogeography of chemosynthetic symbioses (Olu-LeRoy et al. 2007a,b; Olu et al. 2010). In this study, we investigated bacterial symbioses in five metazoan species, four bivalve molluscs: *Acharax* sp. (Solemyidae), *Thyasira* sp. (Thyasiridae), *Elenaconcha guiness*, and *Calyptogena valdiviae* (Vesicomyidae), and one annelid species, *Lamellibrachia* sp. (Siboglinidae). Hosts and associated bacteria were characterized by marker gene sequencing (28S rRNA for metazoans, 16S and 23S rRNAs for bacteria). Occurrence of bacteria in animal tissue was confirmed using fluorescence in situ hybridization (FISH) on metazoan tissue sections. Presence of diagnostic genes encoding particular bacterial metabolic functions, namely adenosine 5′-phosphosulfate (APS) reductase involved in sulfur metabolism and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RubisCO) involved in autotrophic carbon fixation through the Calvin cycle, was tested using specific polymerase chain reaction (PCR) primer sets. Nutrition strategies were investigated using stable isotope analyses (^{13}C, ^{15}N, and ^{34}S) of bacteria-containing tissues. Data from this study were the first available regarding symbiotic associations at the Guiness site in the Gulf of Guinea, a region which is only beginning to be investigated. Results will help documenting and understanding large-scale diversity, biogeographical and depth-related patterns of chemosynthetic symbioses.

Material and Methods

Specimen sampling

Specimens were collected at the Guiness Site (Gulf of Guinea) during the WACS cruise aboard RV *Pourquoi Pas?* using the ROV *Victor 6000* in February 2011 (ROV dive 433, 1°34.65′S, 8°32.91′E, 582 m depth). During the dive, faunal sampling yielded a variety of metazoans, among which those belonging to groups reported as symbiotic were investigated here (Fig. S1). These included representatives of four bivalve species investigated here, namely *Acharax* sp. (Solemyidae), *Thyasira* sp. (Thyasiridae), *E. guiness*, and *C. valdiviae* (Vesicomyidae). *Isorropodon* sp. was also collected and is presented in a separate study (Rodrigues et al. 2012). The annelid species,

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Lamellibrachia sp. (Siboglinidae) was also studied. *Acharax* sp. and juvenile *E. guiness* were recovered within deeper dark sediment in the blade core CL10 in bare, brown sediment next to vesicomyid aggregates. *Calyptogena valdiviae* was sampled using a net sampling (Net 2, Fig. S1F) within a patch of vesicomyids. *Thyasira* specimens were recovered using a net sampling (Net3, Fig. S1H) operated on reduced sediment where empty shells were seen on the bottom. *Lamellibrachia* sp. specimens were collected from a "tubeworm bush" popping up from a crack between two large carbonates. Because of that, only the anterior part could be sampled using the ROV grab, including plume, vestimentum, and part of the trunk, but not the opisthosome. For each of these species, three (labeled 1–3) or more specimens were dissected and appropriate tissues, that is, gills for bivalves and trunk (posterior to the vestimentum) for the siboglinid, were sampled. Tissues were frozen for stable isotope analyses, fixed in ethanol for molecular characterization, fixed in 4% formaldehyde (4°C, 2–4 h).

Molecular characterization

DNA was extracted from tissue fragments of three specimens per species using the DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen, CA). Fragments of metazoan 28S rRNA-encoding genes were PCR amplified and products sequenced. Bacterial genes encoding 16S rRNA were amplified, three separate PCR products were generated from each specimen and pooled, then purified using a QiaQuick Kit (Qiagen), and cloned using a TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, CA). Inserts were sequenced in both directions. Fragments of bacterial genes, some diagnostic of metabolic capabilities, were tested using various primer sets. These included genes encoding 23S rRNA, APS reductase, RubisCO form II. PCR products were sequenced directly, and if sequence displayed no ambiguity such as double peaks, no additional cloning step was added. Other genes were tested, but yielded no product, namely RubisCO form I, and particulate methane mono-oxygenase (pmoA, the enzyme responsible for aerobic methane oxidation). All primers and PCR programs used are summarized in Table 1. Primers for pmoA did not amplify any product in any specimen, only positive controls did produce a band. All products were sequenced by GATC Biotech (Constanz, Germany), and are registered at EMBL under accession numbers HE863781–HE863806.

Analysis of gene sequences

Sequences were compared with sequences available in Genbank using BLAST (Altschul et al. 1990). Nucleic acid sequences of bacterial genes encoding ribosomal RNAs were analyzed, while amino acid sequences were used for protein-encoding genes. Data sets were built for each gene including BLAST hits, symbiont, and reference sequences. Alignments were performed using SINA Web aligner (16S rRNA) or ClustalW (other genes), manually checked and truncated (Pruesse et al. 2007). Phylogenetic analyses were performed using Maximum Likelihood approaches with randomization of sequence input order using the PHYLIP package under a GTR model for nucleic acid sequences and a Jones–Taylor–Thornton model for amino acid sequences (Felsenstein 2002), and using Bayesian approaches with a GTR model and γ rates with a proportion of invariants (DNA sequences) and a mixed model of amino acid substitution (amino acid sequences) run for 200,000–500,000 generations using Mr. Bayes 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Bootstraps values were obtained from 500 or 1000 replicates analyzed using F84 distances and Neighbor-Joining.

Table 1. Primers and PCR parameters used for amplifications.

Gene	Annealing (cycles)	Primer name	Primer sequence (5′→3′)	References
16S	45°C (27)	27F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Lane (1991)
		1492R	GTTACCTTGTTACGACTT	
23S	53°C (35)	3505F	GACCGTCAGCTAAGGTCCCAA	Stewart et al. (2009)
		4761R	CCAGTCAAACTACCCACCATG	
APS reductase	58°C (25)	APS1-FW	TGGCAGATCATGATYMAYGG	Meyer and Kuever (2007)
		APS4-RV	GCGCCAACYGGRCCRTA	
RuBisCO II	62°C (25)	cbbm1_Els	ATCATCAARCCSAARCTSGGCCTGCGTCC	Blazejak et al. (2006)
		cbbm2_Els	MGAGGTGACSGCRCCGTCRCCRGCMCGRTG	
Pmoa	55°C (30)	A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG	Holmes et al. (1995)
		M661R	CCGGMGCAACGTCYTTACC	
28S	52°C (35)	28S-C1	ACCCGCTGAATTTAAGCAT	Williams et al. (2004)
		28S-C2	TGAACTCTCTCTTCAAAGTTCTTTTC	
RubisCO I	55°C (35)	cbbl_1b	CACCTGGACCACVGTBTGG	Blazejak et al. (2006)
		cbbl_2c	CGGTGYATGTGCAGCAGCATNCCG	

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Symbiont localization in metazoan tissue

Fragments of gill (bivalves) and trunk (*Lamellibrachia* sp.) fixed for FISH were dehydrated in increasing ethanol series, embedded in polyethylene glycol distearate : 1-hexadecanol (9:1), cut, and hybridized for 1–3 h at 46°C as previously described (Duperron et al. 2008). Probes and formamide concentrations used are summarized in Table 2. A new probe, Creg821 (5′-GTACCCCCCCCAAC GACT-3′), was designed to target exclusively the symbionts of *C. valdiviae* and was tested against gill tissue of *Laubiericoncha chuni*, a species from the Gulf of Guinea of which the symbiont displays a one-base mismatch in the middle of the sequence. It was shown to hybridize specifically at 30% formamide. All probes were tested with both Cy-3 and Cy-5 fluorochromes. Hybridized sections were visualized under an Olympus BX61 epifluorescence microscope (Olympus, Japan).

Stable isotope analyses

Fragments of frozen tissue (gill for bivalves, trunk for *Lamellibrachia*) were dried (4 days, 60°C) and ground to powder using mortar and pestle. To avoid biases in nitrogen measurements, no HCl treatment was applied (Kaehler and Pakhomov 2001). Values of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ were determined and are expressed as relative per-mL (‰) differences between samples and Pee Dee Belemnite (PDB) and air N_2. Values for sulfur could only be measured in *Lamellibrachia* and *C. valdiviae*, and $\delta^{34}S$ was calculated against Canyon Diablo Troilite. Analyses were performed using a GV Isoprime (U.K.) Stable isotope mass spectrometer using reference standards IA-R042, IA-R045, IA-R046, IA-R005 IA-R006 (nitrogen and carbon) and IA-R027, IA-R061, and IAEA SO5 (sulfur) at Iso-Analytical (Crewe, U.K.).

Results

Host 28S rRNA gene sequences

Some metazoans collected from the Guiness site are described by taxonomists, but molecular data are not yet available and is thus included here. Because cryptic species are reported in the groups here investigated, a molecular marker was used to address whether all specimens investigated in each group belong to a single species, and to provide reference for comparison with future work. Fragments of 28S rRNA were sequenced in order to check whether all specimens or a given morphospecies actually represented a single species, and all specimens within a single morphospecies yielded identical sequences. The *Acharax* sp. sequence displayed 91% similarity with that of *Solemya togata* and *S. velum*. The thyasirid specimens harbored a sequence strictly identical to sequences reported in *Thyasira sarsi* from North Sea and *T. methanophila* from near Concepciòn, Chile. It thus likely belongs to the genus *Thyasira* and will be referred to as *Thyasira* sp. Guiness below. The *E. guiness* and *C. valdiviae* sequences differed by 1% and were most similar (99%) to the sequence from *C. pacifica*, although it must be noted that few 28S rRNA sequences are available from vesicomyids. *Lamellibrachia* sp. 28S rRNA was over 99% identical with that of various siboglinid annelids including

Table 2. FISH probes used in this study, with position in the *Escherichia coli* 16S rRNA sequence, percentage of formamide in hybridization buffer, and target groups.

Probe	Sequence (5′→3′)	Position	% Formamide	Target	Reference
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338	20–40	Most eubacteria	Amann et al. (1990)
GAM42	GCCTTCCCACATCGTTT	42	30	γ-proteobacteria	Manz et al. (1992)
EPSY549	CAGTGATTCCGAGTAACG	549	50	ε-proteobacteria	Manz et al. (1992)
CF319	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	319	40	Bacteroidetes	Manz et al. (1996)
LaSp60	CCATCGTTACCGTTCGAC	60	40	Cohybridization with LaSp640: vestimentiferan symbionts	Duperron et al. (2009)
LaSp640	CACACTCTAGTCAGGCA	640	40	Cohybridization with LaSp60: vestimentiferan symbionts	Duperron et al. (2009)
ImedT2	TAGAGGCCTCCTTTA	193	30	Mytilid thiotrophic symbionts	Duperron et al. (2008)
ThyGui138	TTCCACAGGTTGTCC	138	40	If positive and ThyGui642 negative: thyasirid Guiness symbiont	Rodrigues and Duperron (2011)
ThyGui642	TCTAGTTGAACAGTT	642	40	If negative and ThyGui138 positive: thyasirid Guiness symbiont	Rodrigues and Duperron (2011)
Creg821	GTACCCCCCCCAACGACT	821	30	Thiotrophic symbiont of *Calyptogena valdiviae* specimen 1	This study

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Riftia pachyptila, *Sclerolinum brattstromi*, *Ridgeia* sp., and the aplacophoran *Chaetoderma* sp. (the latter sequence could be questioned, as it is the only nonannelid sequence in over 100 blast hits). It displayed 98% identical positions with the congeneric *L. satsumae*.

Bacterial 16S and 23S rRNAs

All three *Acharax* specimens displayed the same dominant 16S rRNA phylotype (77/80 clones). A second phylotype, differing by only three of 1504 nucleotides, was detected in a single specimen (three clones). Both phylotypes displayed 99% identical positions with the endosymbiont of *Acharax johnsoni* from Pakistan seeps. They clustered with several symbionts from *Acharax* species and with a γ-proteobacterial sequence from the Captain Arutyunov Mud Volcano (MV) in the Gulf of Cadiz (Fig. 1). *Thyasira* sp. Guiness sequence from specimen T3 differed slightly (6/1499 nt) from that found in the two other specimens, and both displayed 99% similarity with a shorter sequence from the symbiont of the thyasirid *Maorithyas hadalis*. Other close relatives (98% identity)

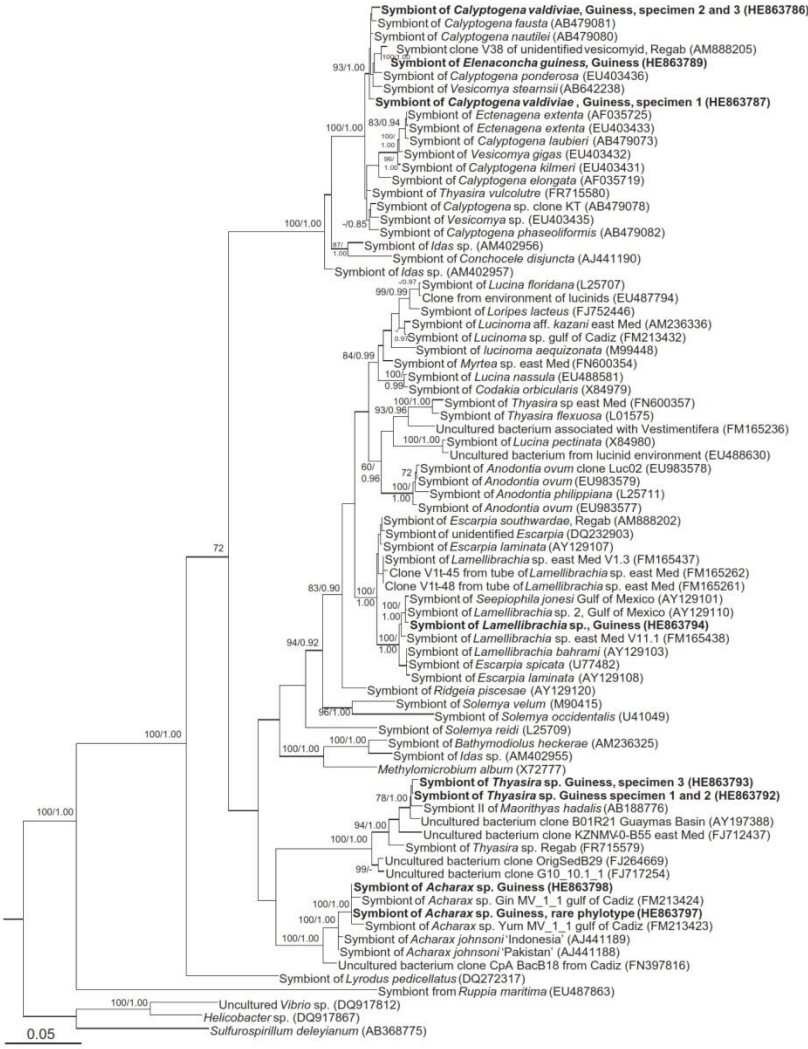


Figure 1. Phylogenetic tree based on the analysis of the bacterial 16 rRNA-encoding gene (1315 nucleotide positions analyzed). Sequences from this study are in bold. For methodology, see Material and Methods. Bootstraps calculated from 1000 NJ replicates (>60 shown) and Bayesian posterior probabilities (>0.85 shown) are displayed at nodes as "bootstrap/probability." Scale bar represents 5% estimated sequence divergence.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

included the symbiont of *Thyasira* sp. from Regab, and sequences from the Guaymas Basin vents (Pacific) and Kazan Mud Volcano (Mediterranean). All clustered together in the tree (Fig. 1). *Elenaconcha guiness* displayed a single 16S rRNA phylotype. *Calyptogena valdiviae* specimen 1 displayed a single 16S rRNA sequence (24 clones) differing by 1% from that found in specimens 2 and 3 (24 and 20 clones, respectively). This sequence also occurred once in specimen 2. *Elenaconcha guiness* and *C. valdiviae* sequences were similar to that of various symbionts associated with vesicomyid clams (98–99% identity) and clustered within the same group of vesicomyid-associated symbionts (Fig. 1). The *E. guiness* sequence was most closely related to a sequence from an undetermined vesicomyid clam collected at the Regab site. The 16S rRNA phylotype associated with *Lamellibrachia* sp. was highly similar to phylotypes recovered from siboglinids within genera *Lamellibrachia*, *Escarpia*, and *Seepiophila* (98–99% similarity) from sites in the Pacific Ocean, Gulf of Mexico, and Mediterranean, and all clustered together in the tree (Fig. 1).

Within a given host species, all specimens displayed identical 23S rRNA-encoding gene fragment sequences. The sequence from *Acharax* sp. was most similar to that of *Thioalkalovibrio sulfidophilus,* but with only 88% identical positions, and branched between two groups including other sequences from this study (Fig. 2). The first group included the sequence from *Thyasira* sp. Guiness and its close relative, the sequence from another *Thyasira* from the eastern Mediterranean (95% identical positions). The second group included the *Lamellibrachia* sp. sequence from this study and its closest relative, the sequence from *Thyasira* sp. from Regab. The 23S rRNA sequence obtained from *E. guiness* was highly similar (>98%) to several vesicomyid sequences with which it clustered in the tree (Fig. 2). For *C. valdiviae*, in which two 16S rRNA sequences were identified, 23S rRNA was cloned and 94 clones analyzed (31 per specimen). All sequences were identical, and 99% similar to those of *C. fausta*, *C. nautilei*, and *C. phaseoliformis*.

APS reductase and RubisCO

Fragments of APS-encoding gene sequences were obtained from all specimens except for the three thyasirids, despite several attempts using various PCR conditions for the

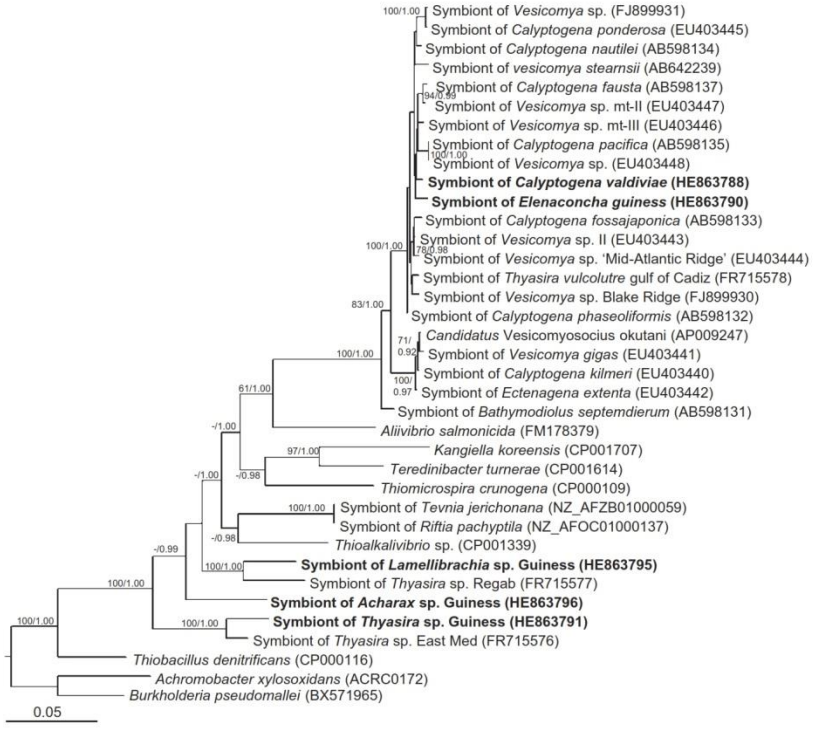


Figure 2. Phylogenetic tree based on the analysis of the bacterial 23 rRNA-encoding gene (1153 nucleotide positions analyzed). Sequences from this study are in bold. For methodology, see Material and Methods. Bootstraps calculated from 1000 NJ replicates (>60 shown) and Bayesian posterior probabilities (>0.85 shown) are displayed at nodes as "bootstrap/probability." Scale bar represents 5% estimated sequence divergence.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

latter. Within a given host species, all three specimens displayed identical sequences except for *C. valdiviae* for which a cloning step was necessary. The APS sequence from *Acharax* sp. displayed 95% identical amino acid positions with the sequence from the Arctic Ocean siboglinid *Oligobrachia haakonmosbiensis*, and with a sequence from ground waters in an evaporative lake. The sequence branched between the two mentioned above, along with *Thiobacillus denitrificans* and an environmental sequence from the Lucky Strike vent field, but with low bootstrap support (Fig. 3). The APS sequence from *E. guiness* was highly similar to several sequences from vesicomyid symbionts, including "*Cand.* Vesicomyosocius okutanii" and *Ruthia magnifica* (>98% identical aa positions). *Calyptogena valdiviae* specimens 1 and 3 displayed the same APS nucleic acid sequence, differing from that of specimen at 2–4% positions (43 clones analyzed). These were mostly silent substitutions, as a single amino acid out of 120 was different. APS nucleic acid sequences were 2–4% different from that of *E. guiness*, representing 0–1 amino acid. *Calyptogena valdiviae* and *E. guiness* sequences clustered together with good support (bootstrap value of 88, posterior probability of 0.99) within the clade including vesicomyid sequences and a sequence from *Thyasira vulcolutre* (Fig. 3). The amino acid sequence from the siboglinid *Lamellibrachia* sp. was identical to one of the two sequences documented from a congeneric species in the Eastern Mediterranean, and branched within a clade of siboglinid APS sequences (Fig. 3).

RubisCO form II was successfully amplified only from *Acharax* sp. and *Lamellibrachia* sp. In *Acharax* sp., the nucleic acid sequence from specimen 2 displayed five differences over 335 positions with the two other specimens (A1 and A3). Because these differences were spread over the whole length of the sequence, and no double peaks were seen in the chromatogram, we suggest this reflects a real difference. They were, however, all synonymous, and the amino acid sequences from all three specimens were strictly identical. Among best BLAST hits, the sequence was 93% identical with that from two siboglinids, *Lamellibrachia anaximandri* from the eastern Mediterranean, and *Sclerolinum contortum* from the Arctic Ocean, but also with several environmental sequences from oil-loaded sediment and suboxic habitats. In the tree, the sequence appeared close to that of *S. contortum* and some environmental sequences (Fig. S2). All three specimens of *Lamellibrachia* sp. displayed identical nucleic acid sequences, and amino acid sequence was most similar to sequences from a *Lamellibrachia* sp. from Sagami Trough near Japan (98%), *Tubificoides benedii*

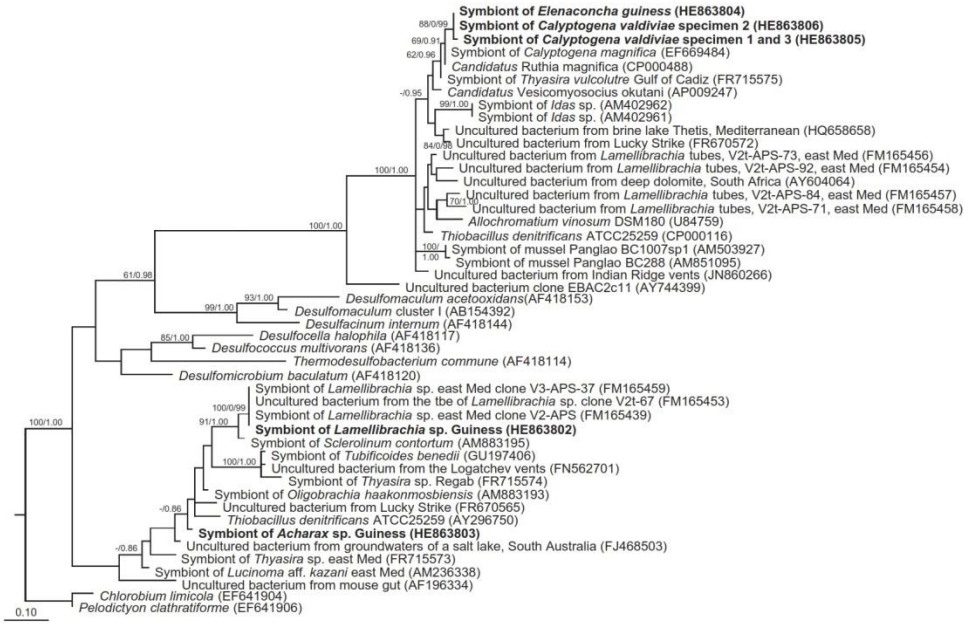


Figure 3. Phylogenetic tree based on the analysis of a fragment of the APS reductase-encoding gene (127 amino acid positions analyzed). Sequences from this study are in bold. For methodology see Material and Methods. Bootstraps calculated from 500 NJ replicates (>60 shown) and Bayesian posterior probabilities (>0.85 shown) are displayed at nodes as "bootstrap/probability." Scale bar represents 10% estimated sequence divergence.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

(95%), two environmental sequences from a sulfide chimney in the Suiyo Seamount (98%), and one from the Eiffel Tower on the Mid Atlantic Ridge (94%). It clustered with the *Lamellibrachia* sequence in the tree, but surprisingly away from sequences from the eastern Mediterranean species (Fig. S2). Despite repeated attempts, no RubisCO form II was obtained from *E. guiness*, *C. valdiviae*, and *Thyasira* sp. Guiness. No RubisCO form I sequence was obtained from any of the specimens using primer sets employed.

Fluorescence in situ hybridization

The presence of bacteria was investigated in the gill tissues of bivalve specimens. *Acharax* sp. gills appeared as typical protobranch ctenidia, and displayed abundant filaments composed of two layers of epithelial cells separated by a space where hemolymph circulates. Bacteria were located in the lateral zone of gill filaments, and occurred in very dense populations in the apical half of epithelial cells, while nuclei were basal (Fig. 4A). All bacteria

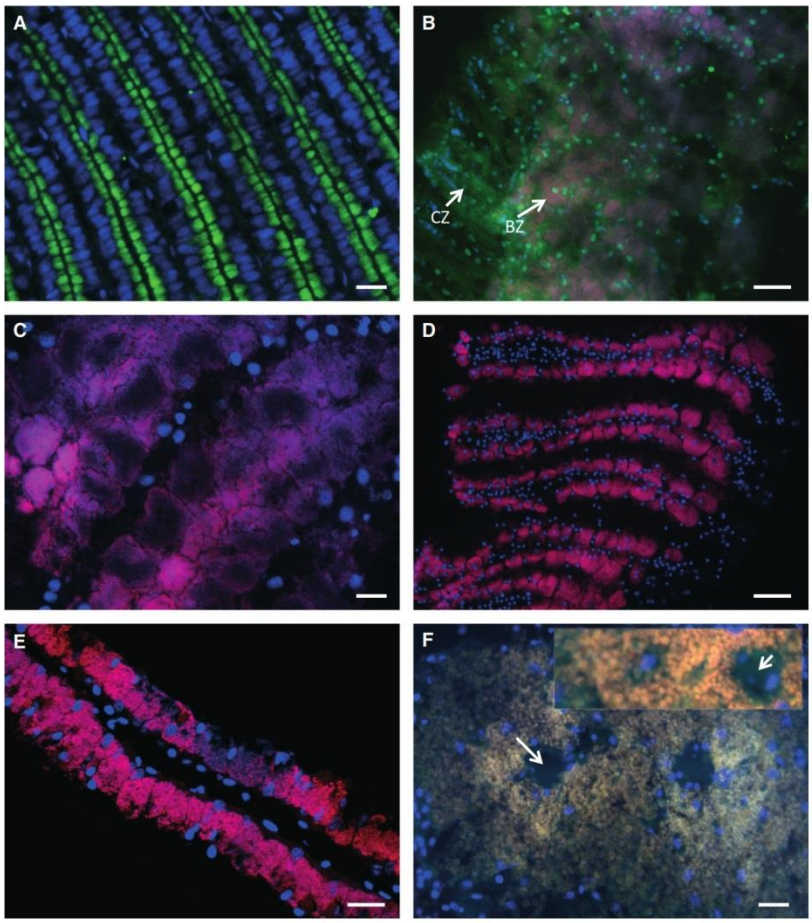


Figure 4. Fluorescence in situ hybridization on cross-sections of metazoan tissue. All slides were counterstained with DAPI (host nuclei visible in blue). Scale bars = 20 μm (A, C, E, F) and 50 μm (B, D). (A) Gill filaments of *Acharax* sp. labeled with probe Gam42 in green (Cy-5). (B) Gills of *Thyasira* sp. Guiness labeled with probes ThyGui642 (Cy-3, in green) and ThyGui138 (Cy-5, in red, yielding pink with addition of DAPI). Ciliated zone (CZ) is mostly devoid of bacteria, appearing green because of autofluorescence. The bacterial signal corresponds to the pink area, located on the lateral zone (bacteriocyte zone BZ) of the gill filament. (C) Another view of the densely colonized lateral zone of *Thyasira* gill filament. Bacteria (probe Gam42) appear in pink. (D) Gill filaments of *Elenaconcha guiness* with ImedT2 signal in red. (E) Gill filament of *Calyptogena valdiviae* specimen 1 hybridized with probe Creg821 (Cy-5, pink). (F) Cross-section through the trunk of *Lamellibrachia* sp. Individual lobes are visible, each organized around a central lumen (arrow on image and upper right insert). Two lobes are visible. Notice the smaller and brighter bacteria closer to the central lumen (image and insert). Signals from probes LaSp640 (Cy-3, in green) and LaSp60 (Cy-5, in red) fully overlap, yielding a yellow color.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

hybridized with the Gam42 probe and signal fully overlaid that of probe Eub338.

Gill tissue of *Thyasira* sp. Guiness was composed of filaments which harbored bacterial symbionts only in part of the lateral zone (Fig. 4B). As in several other thyasirids, bacteriocytes appeared as bags filled with bacteria, with very little to no cytoplasm, and bacteria reached very high densities (Fig. 4C). Nuclei were sometimes located in the apical part of bacteriocytes, but this might be an artifact resulting from fixation. Two probes, ThyGui138 and ThyGui642, both designed to hybridize symbionts of *Thyasira* sp. from Regab, were used (Rodrigues and Duperron 2011). ThyGui138 had no mismatch with the identified 16S rRNA phylotypes in *Thyasira* sp. Guiness, while ThyGui642 had one mismatch in the middle of the target region. As expected, all bacteria hybridized with the former and not the latter at 40% formamide (a faint signal was seen with ThyGui642 at 30% formamide). This strongly suggests that the identified 16S rRNA phylotypes corresponded to the dominant symbionts. Probes Gam42 and Eub338 gave signals, while Cf319 and Epsy549 did not.

Bacteria were abundant in the lateral zone of gill filaments in *E. guiness* and *C. valdiviae*, and hybridized successfully with Eub338. Specimen of *E. guiness* hybridized successfully with ImedT2, initially designed to target mussel sulfur-oxidizing symbionts, but targeting several vesicomyid symbionts, which are closely related (Fig. 4D). Symbiont of *C. valdiviae* specimen 1 hybridized successfully with Creg821, a probe designed to target the 16S rRNA phylotype identified in specimen 1, and displaying two mismatches with the phylotype recovered in the two other specimens (Fig. 4E). Specimens 2 and 4 did not display any hybridization using probe Creg821. Probe Gam42 did not yield a signal, indicating that it might not target the 23S sequence in *E. guiness* and *C. valdiviae*, but this is not possible to check because the target region of the probe was not part of the 23S rRNA fragment sequenced here. As in other bivalves observed in this study, bacteria occurred in dense populations in gill epithelial cells of the lateral zone of gill filaments.

In *Lamellibrachia* sp., bacteria were detected from the anterior to the posterior part of the trunk, posterior to the vestimentum. They occupied most of the volume within the trophosome, and all hybridized with probes Eub338, Gam42, and with probes LaSp60 and LaSp640, which were initially designed in a way that dual hybridization would be specific for symbionts of a *Lamellibrachia* species from the eastern Mediterranean (Fig. 4F, Duperron et al. 2009). These symbionts were highly similar to the 16S rRNA phylotype recovered here, and no mismatch occurred between our sequence and both probe sequences, supporting that they actually represented the dominant symbiont. Bacteria of various sizes occurred, some of which possessed sulfur granules recognizable because of their typical greenish/yellowish coloration when exposing crushed fresh tissue to transmitted light. The trophosome was organized in lobes, and bacteria surrounded a central canal, as evident on some sections. Smallest bacteria occurred immediately around the canal, and bacteria appeared larger as one looked away from the center (Fig. 4F illustrates two such lobes). Around lobes, many host nuclei could be seen and bacteria were no longer visible.

Stable isotope analyses

Ratios of dry weight percentage of carbon to nitrogen were in the range of expected values for metazoans, that is, between 3 and 4, and are summarized, along with signatures, in Table 3. *Acharax* sp. gills had to be pooled to obtain enough material, and yielded $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values

Table 3. Percentage in tissue dry weight and stable isotope signatures (in ‰ against standards) of nitrogen, carbon, and sulfur.

Species	Specimen ID	% N	$\delta^{15}N$	% C	$\delta^{13}C$	% S	$\delta^{34}S$
Acharax sp.	A2 + A3	10.4	1.5	41.6	−29.7		
Thyasira sp.	T1	10.0	7.0	37.0	−36.6		
	T2	9.3	6.1	37.7	−36.4		
	T3	9.7	4.3	37.7	−35.1		
	T4	10.1	5.1	38.4	−35.2		
Elenaconcha guiness	V1	10.2	1.4	37.6	−36.1		
	V2	9.6	1.3	35.0	−35.8		
Calyptogena valdiviae	V1	9.6	−3.5	40.3	−34.7	5.3	5.5
	V2	8.2	0.8	36.7	−36.3	4.4	7.4
	V4	9.4	−0.3	40.2	−36.4	5.3	4.8
Lamellibrachia sp.	S1	6.9	0.4	40.3	−30.1	2.2	−25.6
	S2	9.6	2.0	43.8	−33.8	2.3	−23.1
	S3	10.4	3.5	43.8	−28.7	2.6	−21.6

A2 + A3 indicates that samples from specimens A2 and A3 needed to be pooled so that enough material was available.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

of −-29.7‰, and 1.5‰, respectively. *Thyasira* sp. Guiness yielded mean values of −35.8 ± 0.8 and 5.6 ± 1.2‰; *E. guiness* and *C. valdiviae* had mean values of −35.9 ± 0.2 and 1.4 ± 0.1‰ and −35.8 ± 0.8 and −1.0 ± 2.2‰, respectively. Finally, *Lamellibrachia* sp. displayed mean values of −30.9 ± 2.6 and 2.0 ± 1.6‰. Sulfur stable isotope signature could only be measured in specimens of *Lamellibrachia* and *C. valdiviae*. In the siboglinid, sulfur represented 2.2–2.6% of the biomass, with mean δ^{34}S values of −23.4 ± 2.0‰. In *C. valdiviae*, mean δ^{34}S values of 5.9 ± 1.3‰ were obtained.

Discussion

Evidence for sulfur-oxidizing symbioses in metazoans from Guiness

The data presented here support that five species were investigated based on 28S rRNA gene analysis, a gene slightly more variable than 18S rRNA in bivalves, recently employed to improve species characterization in several families (Taylor et al. 2007). Each species harbors a single dominant bacterial symbiont type located in the gill tissue for bivalves (*Acharax* sp., *Thyasira* sp., *E. guiness*, and *C. valdiviae*), and in the trophosome for the siboglinid *Lamellibrachia* sp. Symbiont densities observed by FISH are high in all cases, supporting the hypothesis of a major contribution of bacteria to their host's physiology and nutrition. All symbionts are closely related to sulfur-oxidizing bacterial symbionts and to environmental bacteria from sulfur-enriched deep-sea reducing environments based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. Although 16S rRNA is sufficient for basic characterization, the 23S rRNA-encoding gene can be a target for FISH probes and is also a valuable phylogenetic marker. Database for the latter does not contain many sequences at this stage, but this gene should be considered, in combination with 16S rRNA, for future studies of symbiont biogeography and evolution. Putative sulfur-linked metabolism of symbionts is supported by the presence of an APS reductase-encoding gene in all cases except *Thyasira* sp. Guiness. In this latter species, the symbiont is, however, related to the symbiont of *Thyasira* sp. Regab from which an APS sequence was recently obtained (Rodrigues and Duperron 2011). It is thus possible that the lack of an APS sequence here is due to mismatches in the primers' target regions rather than due to absence of a sulfur metabolism. Autotrophy can be postulated for symbionts of *Acharax* sp. and *Lamellibrachia* sp. thanks to the presence of Type II RubisCO. This type of RubisCO is expected in Siboglinidae, but not in *Acharax*, as symbionts of another Solemyidae, *Solemya velum*, were reported to harbor Type IA RubisCO (Schwedock et al. 2004; Stewart et al. 2005). Type II RubisCO is also reported in Vesicomyidae, it is thus surprising that it could not be obtained here.

Carbon stable isotope signatures measured here range from −28.7 to −36.6‰, within the range of values expected for chemoautotrophy-derived carbon (−25 to −40‰) (Fisher 1995). Values for δ^{13}C and δ^{15}N in *Acharax* sp. Guiness are comparable with values reported for other deep-sea solemyids (−28 to −35‰ for carbon, −3.4 to 6.1‰ for nitrogen for seep species in the Gulf of Cadiz (Rodrigues et al. 2010)). In *S. velum*, similar carbon signatures yielded an estimated bacterial contribution to host carbon up to 98% (Conway et al. 1989). In thyasirids, values between −37.2 and −29.0‰ for carbon, and −5.2 and 4.8‰ for nitrogen are reported from seep species in the Gulf of Cadiz and eastern Mediterranean (Carlier et al. 2010; Rodrigues et al. 2010). Carbon values reported here are within this range, while nitrogen values are slightly higher (from 4.3 to 7.0‰). Values for *E. guiness* and *C. valdiviae* are within the range of values commonly reported for seep vesicomyids, including those from the nearby Regab site (δ^{13}C around −36.0‰, δ^{15}N between −1.0 and 3.5‰; Olu et al. 2009). Values reported for *Lamellibrachia* sp. from Guiness are close to values obtained from species collected at sites such as Regab or the eastern Mediterranean (δ^{13}C between −36.2 and −24.2‰ and δ^{15}N between 1.9 and 2.5‰; Duperron et al. 2009; Olu et al. 2009. Thanks to the symbiont's ability to store sulfur granules in Siboglinidae, δ^{34}S could be measured and yielded highly negative values similar to those of various organisms with sulfur-oxidizing symbionts (Fry et al. 1983; Vetter and Fry 1998; Carlier et al. 2010). Overall, δ^{13}C values measured in all five species are in the range of values reported from other species within their families for which a sulfur-oxidizing symbiosis is documented. It supports that *Acharax* sp., *E. guiness*, *C. valdiviae,* and *Lamellibrachia* sp. harbor sulfur-oxidizing symbioses and derive most of their carbon from bacterial chemoautotrophy. *Thyasira* sp. Guiness also likely harbors a sulfur-oxidizing symbiosis, but our inability to amplify APS reductase makes the conclusion less affirmative. Its less-negative nitrogen signature compared with other species also suggests that it uses distinct nitrogen sources.

Comparison with other symbioses

Acharax sp. Guiness harbors symbionts which are closely related to those of *Acharax* species from the Gulf of Cadiz (Yuma and Ginsburg MVs, around 900 m depth), but also from very distant locations including seeps near the Oregon, Pakistan, or Indonesia and various depths from 780 to 2940 m (Imhoff et al. 2003; Rodrigues et al. 2010). They all form a tight cluster suggesting monophyly of *Acharax*-associated symbionts. Although hosts belong

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

to the same family, *Acharax* symbionts are not closely related to symbionts of *Solemya*, suggesting that differences exist between these two symbioses. For example, the maternal inheritance of symbionts documented in *Solemya* cannot be inferred for *Acharax* without a dedicated study (Cary 1994). Similarly, *Acharax* symbionts appear to possess a Type II RubisCO not closely related to the Type IA RubisCO identified in *Solemya velum* (Schwedock et al. 2004). The Solemyidae family dates back to at least the middle Ordovician, 460–480 MYA (Pojeta 1988), and symbiosis was supposed to have been established prior to the diversification (Distel 1998). Symbionts should thus be related, but it is also possible that symbionts were replaced by new bacteria during evolution of the group, or that differences arose because of recombination events involving metabolic pathways in bacteria. This results in the lack of host–symbiont cospeciation patterns. The distinct symbionts in *Acharax* and *Solemya* species might be linked to their distinct depth distribution, as *Acharax* are usually deeper-dwelling species than *Solemya*. Data regarding deep-sea Solemyidae symbioses are needed before these hypotheses can be properly tested, as most studies investigated shallower species *Solemya velum* and *S. reidi* (Stewart and Cavanaugh 2006).

For all three bacterial genes investigated, *E. guiness* and *C. valdiviae* specimens displayed sequences with high similarity to available vesicomyid-associated symbiont sequences. This indicates that they display similar type of symbiosis. Unexpectedly, specimen 1 of *C. valdiviae* displayed a 16S rRNA symbiont phylotype distinct from that of the two other specimens, a result confirmed by FISH. Sequences from the 23S rRNA were identical, meanwhile APS sequence from specimen 2 was different from that of specimen 1 and 3. This reveals a certain level of genetic heterogeneity in this species, and may illustrate intraspecific variation in dominant symbiont strain. This is in line with recent work evidencing occasional nonmaternal inheritance of symbionts in Vesicomyidae (Stewart et al. 2008). At Guiness and at the nearby site Regab, several vesicomyid species are documented, some co-occurring in the same aggregates (von Cosel and Olu 2009). Future work will thus test whether co-occurrence could favor symbiont gene or strain exchanges.

Gill structure of *Thyasira* sp. Guiness corresponds to the Type 3 described in *Thyasira* and *Conchocele* by Dufour (Fig. 1D in Dufour 2005). Patterns observed in FISH images resemble those obtained for other *Thyasira* species from the eastern Mediterranean, Gulf of Cadiz and Regab (Brissac et al. 2011; Rodrigues and Duperron 2011). Thyasirid-associated symbionts belong to at least three distinct lineages within γ-proteobacteria, suggesting multiple independent events of symbiont acquisition during evolution (Imhoff et al. 2003; Rodrigues and Duperron 2011). Symbiont 16S rRNA sequences from *Thyasira* sp. Guiness clusters with symbionts of *M. hadalis* (Fujiwara et al. 2001) in a group, which also includes symbionts from *Thyasira* sp. Regab. Specimen 3 displayed a slightly different 16S (but identical 23S) rRNA sequence compared with the two other conspecifics, which could indicate uptake of a slightly distinct bacterial strain. It must be noted that contrary to the 16S, the 23S rRNA sequence clusters with the *Thyasira* sp. from the eastern Mediterranean, and not with that of *Thyasira* sp. Regab. These last two points indicate that strain heterogeneity within and among members of a single thyasirid species should be further investigated based on more specimens, when available.

Lamellibrachia sp. harbors dense populations of sulfur-oxidizing bacteria within its trophosome, as seen in other large siboglinid annelids. Sulfur granules seen in some bacteria indicate ability to store sulfur, which can buffer temporal variations in fluid emissions (Duperron et al. 2009). Trophosome sections looked circular, with a central lumen in the cylinder, surrounded by cells containing bacteria, which appeared larger the further away from the lumen. This resembles the structure of lobules documented from *Riftia pachyptila*, organized around an axial blood vessel, and a gradient from small rod-shaped to large coccoid-shaped bacteria toward the periphery (Bosch and Grasse 1984; Bright and Sorgo 2003; Katz et al. 2011). This organization was hypothesized to reflect progressive differentiation of host cells and growth of symbionts from center, with cells acting as stem cells, to the periphery of each lobule. Symbionts are very closely related to those of various *Lamellibrachia*, *Escarpia*, and *Seepiophila* species based on 16S rRNA, and amino acid sequence from APS reductase was identical to that of *Lamellibrachia* symbionts from the eastern Mediterranean (Duperron et al. 2009). RubisCO was also highly similar to a *Lamellibrachia* sp. symbiont sequence, but from Sagami Trough near Japan and not eastern Mediterranean (Elsaied and Naganuma 2001). Overall, the high level of similarity observed for all gene sequences with those from other Siboglinidae prevents any detailed investigation of symbiont biogeography, and new marker genes with higher levels of variations should be developed.

Conclusion

Chemosymbiotic metazoans at the Guiness site harbor sulfur-oxidizing symbioses involving a dominant bacterial 16S rRNA phylotype in each species. Symbiont phylotypes are not shared among host species, or with other documented species, but these symbioses are very similar to symbioses documented in their respective groups. Symbionts contribute significantly to host nutrition, while organic matter

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

from the downward flux of detritic material is probably not a major source. Gene analyses revealed heterogeneity in symbiont sequences in *Thyasira* sp. Guiness and *C. valdiviae*, and numerous incongruencies between 16S rRNA-based trees and trees based on other bacterial genes. This could illustrate occurrence of several copies of some genes, and recombinations of functional genes between strains of symbionts, or between symbionts and environmental bacteria. More robust databases of symbiont sequences for 23S RNA, APS reductase, and RubisCO are needed, and variability of symbiont lineages within a single host species should be investigated. None of the genes used here is alone appropriate for properly investigating symbiont biogeography, because of a lack of sequence variability. Multiple new markers need to be tested to better understand the biogeography and evolution of symbiosis in the metazoan groups investigated.

Acknowledgments

We thank captain, pilots, and crew of *RV Pourquoi Pas?* and ROV *Victor* 6000 for their invaluable efforts during the WACS cruise, along with chief scientist and colleagues involved. We also thank reviewers for their helpful comments. Cruise was funded by Ifremer. Research was funded through grants from ANR ("DeepOases"), UPMC, CNRS, and GDR Ecchis. C. R. benefited from a postdoctoral grant from Portuguese FCT (SFRH/BPD/64154/2009); K. S. was funded through a Ph.D. grant from the Marie Curie Actions Initial Training Network (ITN) SYMBIOMICS; C. D. benefited from a postdoctoral grant from Ifremer.

Conflict of Interest

None declared.

References

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Mol. Biol. 215:403–410.

Amann, R., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56:1919–1925.

Andersen, A., S. Hourdez, B. Marie, D. Jollivet, F. H. Lallier, and M. Sibuet. 2004. *Escarpia southwardae* sp. nov., a new species of vestimentiferan tubeworm (Annelia, Siboglinidae) from West African cold seeps. Can. J. Zool. 82:980–999.

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

Bosch, C., and P. Grasse. 1984. Partial cycle of chemoautotroph symbiotic bacteria and their relations with the bacteriocytes in *Riftia pachyptila* Jones (pogonophora, Vestimentifera). 1. The trophosome and the bacteriocytes. C. R. Acad Sci. Ser. III-VIE. 299:371–376.

Bright, M., and A. Sorgo. 2003. Ultrastructural reinvestigation of the trophosome in adults of *Riftia pachyptila* (Annelida, Siboglinidae). Invertebr. Biol. 122:345–366.

Brissac, T., C. F. Rodrigues, O. Gros, and S. Duperron. 2011. Characterization of bacterial symbioses in *Myrtea* sp. (Bivalvia: Lucinidae) and *Thyasira* sp. (Bivalvia: Thyasiridae) from a cold seep in the eastern Mediterranean. Mar. Ecol. 32:198–210.

Cambon-Bonavita, M. A., T. Nadalig, E. Roussel, E. Delage, S. Duperron, J. C. Caprais, et al. 2009. Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. Deep-Sea Res. II 56:2248–2258.

Carlier, A., B. Ritt, C. F. Rodrigues, J. Sarrazin, K. Olu, J. Grall, et al. 2010. Heterogeneous energetic pathways and carbon sources on deep eastern Mediterranean cold seep communities. Mar. Biol. 157:2545–2565.

Cary, S. C. 1994. Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3:121–130.

Conway, N., J. McDowell Capuzzo, and B. Fry. 1989. The role of endosymbiotic bacteria in the nutrition of *Solemya velum*: evidence for a stable isotope analysis of endosymbionts and host. Limnol. Oceanogr. 34:249–255.

von Cosel, R., and K. Olu. 2009. Large vesicomyidae (Mollusca: Bivalvia) from cold seeps in the Gulf of Guinea off the coasts of Gabon, Congo and northern Angola. Deep-Sea Res. II 56:2350–2379.

Dando, P. R. 2010. Biological communities at marine shallow-water vent and seep sites. Pp. 333–378 *in* S. Kiel, ed. The vent and seep biota: topics in geobiology. Vol. 33. Springer, the Netherlands.

Distel, D. L. 1998. Evolution of chemoautotrophic endosymbioses in bivalves – bivalve-bacteria chemosymbioses are phylogenetically diverse but morphologically similar. Bioscience 48:277–286.

Distel, D., A. Baco, E. Chuang, W. Morrill, C. Cavanaugh, and C. Smith. 2000. Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? Nature 403:725–726.

Dubilier, N., C. Bergin, and C. Lott. 2008. Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. Nat. Rev. Microbiol. 6:725–740.

 © 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Dufour, S. C. 2005. Gill anatomy and the evolution of symbiosis in the bivalve family Thyasiridae. Biol. Bull. 208:200–212.

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

Duperron, S., S. Halary, J. Lorion, M. Sibuet, and F. Gaill. 2008. Unexpected co occurence of 6 bacterial symbionts in the gill of the cold seep mussel *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae). Environ. Microbiol. 10:433–445.

Duperron, S., D. De Beer, M. Zbinden, A. Boetius, V. Schipani, N. Kahil, et al. 2009. Molecular characterization of bacteria associated with the trophosome and the tube of *Lamellibrachia* sp., a siboglinid annelid from cold seeps in the eastern Mediterranean. FEMS Microbiol. Ecol. 69: 395–409.

Elsaied, H. E., and T. Naganuma. 2001. Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit genes from deep-sea microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 67:1751–1765.

Felsenstein, J. 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA.

Fisher, C. R. 1995. Towards an appreciation of hydrothermal-vent animals: their environment, physiological ecology, and tissue stable isotope values. Pp. 297–316 *in* S. E. Humphris, R. A. Zierenberg, L. S. Mullineaux and R. E. Thomson, eds. Seafloor hydrothermal systems: physical, chemical, biological, and geological interactions, Geophys. Monogr. Ser. Vol. 91. AGU, Washington, DC.

Fry, B., H. Gest, and J. M. Hayes. 1983. Sulfur isotopic composition of deep-sea hydrothermal vent animals. Nature 306:51–52.

Fujiwara, Y., C. Kato, N. Masui, K. Fujikura, and S. Kojima. 2001. Dual symbiosis in the cold-seep thyasirid clam *Maorithyas hadalis* from the hadal zone in the Japan Trench, western Pacific. Mar. Ecol. Prog. Ser. 214:151–159.

Holmes, A. J., A. Costello, M. E. Lidstrom, and J. C. Murrell. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia may be related. FEMS Microbiol. Lett. 132:203–208.

Imhoff, J. F., H. Sahling, J. Süling, and T. Kath. 2003. 16S rDNA-based phylogeny of sulphur-oxidizing bacterial endosymbionts in marine bivalves from cold-seep habitats. Mar. Ecol. Prog. Ser. 249:39–51.

Jorissen, F. J., E. Bicchi, G. Duchemin, J. Durrieu, F. Galgani, L. Cazes, et al. 2009. Impact of oil-based drill mud disposal on benthic foraminiferal assemblages on the continental margin off Angola. Deep-Sea Res. II 56:2270–2291.

Kaehler, S., and E. Pakhomov. 2001. Effects of storage and preservation on the delta C-13 and delta N-15 signatures of selected marine organisms. Mar. Ecol. Prog. Ser. 219:299–304.

Katz, S., W. Klepal, and M. Bright. 2011. The *Osedax* trophosome: organization and ultrastructure. Biol. Bull. 220:128–139.

Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Pp. 115–175 *in* E. Stakebrandt and M. Goodfellow, eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons, New York.

Levin, L. A., D. W. James, C. M. Martin, A. E. Rathburn, L. H. Harris, and R. H. Michener. 2000. Do methane seeps support distinct macrofaunal assemblages? Observations on community structure and nutrition from the northern California slope and shelf. Mar. Ecol. Prog. Ser. 208:21–39.

Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K. H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. Syst. Appl. Microbiol. 15:593–600.

Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K. H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment. Microbiology 142:1097–1106.

Meyer, B., and J. Kuever. 2007. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5′-phosphosulfate reductase-encoding genes (aprBA) among sulfur-oxidizing prokaryotes. Microbiology 153:3478–3498.

Olu, K., J. C. Caprais, J. Galéron, R. Causse, R. von Cosel, H. Budzinski, et al. 2009. Influence of seep emission on the non-symbiont-bearing fauna and vagrant species at an active giant pockmark in the Gulf of Guinea (Congo–Angola margin). Deep-Sea Res. II 56:2380–2393.

Olu, K., E. E. Cordes, C. R. Fisher, J. M. Brooks, M. Sibuet, and D. Desbruyères. 2010. Biogeography and potential exchanges among the Atlantic Equatorial Belt cold-seep faunas. PLoS ONE 5:e11967.

Olu-LeRoy, K., M. Sibuet, A. Fiala-Médioni, S. Gofas, C. Salas, A. Mariotti, et al. 2004. Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: composition, symbiosis, and spatial distribution on mud volcanoes. Deep-Sea Res. I 51:1915–1936.

Olu-LeRoy, K., J. C. Caprais, A. Fifis, M. C. Fabri, J. Galéron, H. Budzinski, et al. 2007a. Cold seep assemblages on a giant pockmark off West Africa: spatial patterns and environmental control. Mar. Ecol. 28:1–16.

Olu-LeRoy, K., R. Von Cosel, S. Hourdez, and D. Jollivet. 2007b. Amphi-Atlantic cold-seep *Bathymodiolus* species complexes across the equatorial belt. Deep-Sea Res. 54:1890–1911.

Pojeta, J. 1988. The origin and Paleozoic diversification of solemiod pelecypods. NM Bur. Mines Min. Res. Mem. 44:201–222.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Pruesse, E., C. Quast, K. Knittel, B. M. Fuchs, L. Wolfgang, J. Peplies, et al. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Res. 35:7188–7196.

Riou, V., A. Colaço, S. Bouillon, A. Khripounoff, P. Dando, P. Mangion, et al. 2010. Mixotrophy in the deep sea: a dual endosymbiotic hydrothermal mytilid assimilates dissolved and particulate organic matter. Mar. Ecol. Prog. Ser. 405:187–201.

Rodrigues, C. F., and S. Duperron. 2011. Distinct symbiont lineages in three thyasirid species (Bivalvia: Thyasiridae) form the eastern Atlantic and Mediterranean Sea. Naturwissenschaften 98:281–287.

Rodrigues, C. F., G. Webster, M. R. Cunha, S. Duperron, and A. J. Weightman. 2010. Chemosynthetic bacteria found in bivalve species from mud volcanoes of the Gulf of Cadiz. FEMS Microbiol. Ecol. 73:486–499.

Rodrigues, C. F., M. Cunha, K. Olu, and S. Duperron. 2012. The smaller vesicomyid bivalves in the genus *Isorropodon* (Bivalvia, Vesicomyidae, Pliocardiinae) also harbour chemoautotrophic symbionts. Symbiosis 56:129–137.

Ronquist, F., and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572–1574.

Schwedock, J., T. L. Harmer, K. M. Scott, H. J. Hektor, A. P. Seitz, M. C. Fontana, et al. 2004. Characterization and expression of genes from the RubisCO gene cluster of the chemoautotrophic symbiont of *Solemya velum*: cbbLSQO. Arch. Microbiol. 182:18–29.

Sibuet, M., and K. Olu. 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependance of deep sea cold seep communities at active and passive margins. Deep-Sea Res. II 45:517–567.

Smith, P. J., S. M. McVeagh, Y. Won, and R. C. Vrijenhoek. 2004. Genetic heterogeneity among New Zealand species of hydrothermal vent mussels (Mytilidae: Bathymodiolus). Mar. Biol. 144:537.

Stewart, F. J., and C. M. Cavanaugh. 2006. Bacterial endosymbioses in *Solemya* (Mollusca: Bivalvia) – model systems for studies of symbion-host adaptation. Antonie Van Leeuwenhoek 90:343–360.

Stewart, F. J., L. G. Newton, and C. M. Cavanaugh. 2005. Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic-anoxic interfaces. Trends Microbiol. 13:439–448.

Stewart, F. J., C. R. Young, and C. M. Cavanaugh. 2008. Lateral symbiont acquisition in a maternally transmitted chemosynthetic clam endosymbiosis. Mol. Biol. Evol. 25:673–683.

Stewart, F. J., C. R. Young, and C. M. Cavanaugh. 2009. Evidence for homologous recombination in intracellular chemosynthetic clam symbionts. Mol. Biol. Evol. 26: 1391–1404.

Tarasov, V. G., A. V. Gebruk, A. N. Mironov, and L. I. Moskalev. 2005. Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: two different phenomena? Chem. Geol. 224:5–39.

Taylor, J. D., S. T. Williams, and E. A. Glover. 2007. Evolutionary relationships of the bivalve family Thyasiridae (Mollusca: Bivalvia), monophyly and superfamily status. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 87:565–574.

Van Dover, C. L. 2000. The ecology of deep-sea hydrothermal vents. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Vetter, R. D., and B. Fry. 1998. Sulfur contents and sulfur-isotope compositions of thiotrophic symbioses in bivalve molluscs and vestimentiferan worms. Mar. Biol. 132:453–460.

Williams, S. T., J. D. Taylor, and E. Glover. 2004. Molecular phylogeny of the Lucinoidea (Bivalvia): nonmonophyly and separate acquisition of bacterial chemosymbiosis. J. Moll. Stud. 70:187–202.

Supporting Information

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

Figure S1. Organisms investigated in this study and sampling sites. *Acharax* sp. (A); *Thyasira* sp. with left valve removed (B), the gill is visible is pink; juvenile specimens of *Elenaconcha guiness* (C); adult specimen of *Calyptogena valdiviae* (D, photo by Ann Andersen); anterior part of *Lamellibrachia* sp. out of their tubes (E) and as seen in situ (G). The gill appears pinkish, the vestimentum is brown; Net 2 sampling site (F); net 3 sampling site (H).

Figure S2. Phylogenetic tree based on the analysis of a fragment of the RubisCO-encoding gene (117 amino acid positions analyzed). Sequences from this study are in bold. For methodology see Material and Methods. Tree was rooted on several groups of Type I RubisCO, not shown. Bootstraps calculated from 500 NJ replicates (>60 shown) and Bayesian posterior probabilities (>0.85 shown) are displayed at nodes as "bootstrap/probability." Scale bar represents 5% estimated sequence divergence.

© 2012 The Authors. Published by Blackwell Publishing Ltd.

Annexe 2 Résumé en polonais – Streszczenie pracy

Tytuł pracy: „Cykle życiowe bakterii chemosyntetyzujących żyjących w symbiozie z małżami w metano-siarczkowych ekosystemach głębokomorskich.”

Głębokomorskie ekosystemy ekstremalne takie jak: źródła hydrotermalne, zimne wysięki (lub oceaniczne wypływy) czy martwe szczątki organiczne pochodzenia roślinnego (np. zatopione drewno) i zwierzęcego (np. szkielety wielorybów), rozproszone są na różnych głębokościach w wodach Wszechoceanu. Są to siedliska bogate w zredukowane związki chemiczne, będące produktem podwodnej działalności wulkanicznej, bądź biologicznych procesów rozkładu martwej materii. Produkcja pierwotna chemosyntetyzujących bakterii jest podstawą łańcuchów troficznych w tego typu ekosystemach, uniezależniając je od dostępu światła. Odgrywa ona również bardzo ważną rolę w cyklach biogeochemicznych, umożliwiając cyrkulację pierwiastków w obrębie całej ekosfery. Chemosynteza jest procesem dwuetapowym, którego pierwsza faza polega na pozyskaniu i zmagazynowaniu w postaci ATP energii metabolicznej z utleniania zredukowanych związków organicznych lub substancji mineralnych takich jak: amoniak (NH_3), siarkowodór (H_2S), siarka elementarna (S), wodór (H_2), tlenek węgla (CO) lub metan (CH_4). W drugiej fazie, energia ta jest wykorzystywana do wytworzenia bardziej złożonych związków organicznych z wody (H_2O) oraz asymilowanego dwutlenku węgla (CO_2) lub metanu (CH_4).

Istnieje wiele przykładów związków symbiotycznych pomiędzy bakteriami chemosyntetyzującymi a przedstawicielami fauny kolonizującej ekstremalne ekosystemy w głębokim oceanie. Dzięki tego typu symbiozom, ich gospodarz ma zapewnione często jedyne źródło pożywienia, w postaci związków organicznych produkowanych przez symbionty w procesie chemosyntezy. Zaś bakterie te, kolonizując wnętrze lub powierzchnię ciała gospodarza, otrzymują bardziej stabilne warunki do życia. W celu zapewnienia ciągłości symbioz między bakteriami chemosyntetyzującymi i zwierzętami morskimi, na drodze ewolucji pomiędzy partnerami, zostały wypracowane dwie strategie przenoszenia symbiontów między kolejnymi pokoleniami gospodarzy: w linii matecznej za pośrednictwem gamet lub poprzez nabywanie ich na pewnym etapie życia ze środowiska, z puli bakterii wolno żyjących.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było udzielenie odpowiedzi na pytania związane z cyklami życiowymi bakterii symbiotycznych w środowiskach ekstremalnych: 1) Czy wolno żyjące bakterie chemosyntetyzujące, blisko spokrewnione z symbiontami, są obecne w środowisku i jaka jest ich bioróżnorodność? 2) W jaki sposób bakterie symbiotyczne są przekazywane między pokoleniami ich gospodarza? 3) Jak zmienia się równowaga między gospodarzem i jego symbiontami w odpowiedzi na stresy abiotyczne takie jak: wysoka temperatura wody, zwiększone stężenie siarczków oraz dekompresja podczas wydobycia na powierzchnię oceanu?

Różnorodność form bakterii, które osiedliły się na dwóch typach podłóż (kostki drewna oraz siano z suszonej lucerny) umieszczonych w różnych siedliskach w Oceanie Atlantyckim i Morzu Śródziemnym, została zbadana poprzez analizę porównawczą sekwencji nukleotydowych genów, kodujących 16S RNA małej podjednostki rybosomu, za pomocą pirosekwencjonowania. Stwierdzono, że bakterie symbiotyczne lub ich blisko spokrewnione formy są obecne w tych siedliskach, stanowiąc kilkuprocentową frakcję wszystkich bakterii i mogą kolonizować substraty organiczne. Różnorodność genetyczna oraz rozmieszczenie symbiontów w różnych siedliskach są uzależnione od obecności ich potencjalnych gospodarzy w analizowanym regionie.

Sposób przekazywania symbiontów pomiędzy pokoleniami małż z gatunku *Isorropodon bigoti* z Zatoki Gwinejskiej był obiektem badań kolejnej części tej pracy. Na podstawie identyfikacji molekularnej i obserwacji mikroskopowej bakterii symbiotycznych w komórkach jajowych tego gatunku małż oraz w jego stadium post-larwalnym, wykazano przekazywanie symbiontów w linii matecznej. Do przekazania symbiontów potomstwu wystarcza zaledwie kilka komórek bakteryjnych obecnych wewnątrz pojedynczej komórki jajowej.

W ostatniej części niniejszej pracy badano wpływ dekompresji, stresu chemicznego i termicznego na względną liczebność dwóch typów endosymbiontów małż z gatunku *Bathymodiolus azoricus* przy użyciu trójwymiarowej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* oraz pirosekwencjonowania. Względna objętość jaką zajmują symbionty siarkowe i metanotroficzne w bakteriocytach nie zmienia się w wyniku dekompresji, podobnie jak objętość bakterii występujących w skrzelach małż wydobytych na powierzchnię przy użyciu akwariów utrzymujących ciśnienie wody. Podwojenie się względnej objętości bakterii siarkowych w komórkach skrzeli gospodarza jest z kolei odpowiedzią na 5-godzinną

ekspozycję w zwiększonym stężeniu siarczków wewnątrz akwariów utrzymujących naturalne dla tego gatunku ciśnienie wody. Stres termiczny powoduje zaś niewielki wzrost względnej objętości zajmowanej przez bakterie metanotroficzne. Podobne tendencje zaobserwowano w wynikach pirosekwencjonowania, co potwierdza użyteczność tej szybszej, choć droższej metody liczenia symbiontów.

Wszystkie wyniki uzyskane podczas tych badań zaprezentowane są w formie publikacji naukowych w rozdziałach 5-7, dyskusja wyników znajduje się w rozdziale 8.

Table des illustrations

Figure 0-1 : Une carte bathymétrique des océans terrestres centrée sur l'océan Atlantique avec la dorsale médio-atlantique visible sous la forme d'une chaîne de « montagnes sous-marines » au milieu. Les zones côtières (aux profondeurs n'excédant pas 200 m) sont marquées en rose, le talus continental en gris foncé, les plaines abyssales en bleu et les dorsales en gris clair. Source : First Census of Marine Life 2010: Highlights of a Decade of Discovery, 2010 www.coml.org XII
Figure 1-1 : Un exemple de fumeur noir actif d'une source hydrothermale de la dorsale médio-atlantique, site Rainbow, marqueur OBS 57 US, mission BioBaz 2013, plongée 519. Photo Source : Ifremer 2
Figure 1-2 : Schéma de la formation d'un fumeur ; le fluide chaud contenant des ions Ca^{2+} se mélange avec l'eau de mer froide qui contient des ions SO_4^{2-}, le sulfate de calcium $CaSO_4$ (ou anhydrite) précipite autour de la sortie du fluide et constitue un support pour la précipitation des autres minéraux. Source : Tivey, 2004 4
Figure 1-3 : Schéma de la circulation d'eau dans la croûte océanique ; l'eau pénètre dans des fissures du plancher océanique, se réchauffe au contact du magma et sa pression augmente, le fluide remonte vers la surface en traversant et lessivant les roches riches en minéraux, le fluide chaud s'enrichit ainsi en minéraux, ressort à la surface du rift et forme des fumeurs par précipitation au contact avec l'eau de mer froide. Source : Tivey, 2004 5
Figure 1-4 : Carte de la distribution globale des sources hydrothermales. Source : Beaulieu *et al.*, 2010, www.interridge.org 8
Figure 1-5 : Site d'émission de fluides froids riches en méthane colonisé par les bivalves de la famille des Vesicomyidae enfouis dans un sédiment riche en sulfures. Golfe de Guinée, large de l'Angola, mission Biozaïre 2. Source : Ifremer 9
Figure 1-6 : Schémas expliquant le fonctionnement des suintements froids au niveau d'une marge passive (A) et d'une marge active dans la zone de subduction (B). Source : Sibuet and Olu-Le Roy, 2002 11
Figure 1-7 : Carte de répartition globale des sites de suintements froids. Source : Krey *et al.*, 2009 12
Figure 1-8 : Schéma expliquant les étapes de la colonisation des bois coulés par des bivalves foreurs du bois, puis par des bactéries décomposant la cellulose, finalement par la faune à base chimiosynthétique. Source : Bienhold *et al.*, 2013 13
Figure 1-9 : Un exemple de la faune colonisant une carcasse de baleine de 13,5 m de longueur, trouvée à 254 m de profondeur au Cap Nomamisaki au Japon. Photo prise en juillet 2005. Source : Fujiwara *et al.*, 2007 15
Figure 2-1 : Des exemples de symbioses chimiosynthétiques dans différents écosystèmes marins, avec de genres d'animaux qui vivent grâce aux associations symbiotiques sont énumérés à côté de chaque écosystème : a) des écosystèmes côtiers, b) des écosystèmes sur le talus continental, c) des suintements froids, d) des débris organiques (des bois coulés et des carcasses de baleines) e) des sources hydrothermales. Source : Dubilier *et al.*, 2008 23
Figure 2-2 : Un annélide tubicole géant *Riftia pachyptila* de la famille des Siboglinidae dans les sources hydrothermales sur la dorsale est-Pacifique. Source : Ifremer 24
Figure 2-3 : Un annélide tubicole *Escarpia southwardae* (Siboglinidae) dans les suintements froids du golfe de Guinée. Source : Ifremer 25
Figure 2-4 : Des crevettes *Rimicaris exoculata* à la surface d'une cheminée hydrothermale du site Rainbow au point remarquable « France 5 », mission BioBaz 2013. Source : Ifremer 26
Figure 2-5 : Des gastéropodes *Alviniconcha hessleri* des sources hydrothermales dans le bassin de Lau méridional (sud-ouest Pacifique). Source : Ifremer 27

Figure 2-6 : *Thyasira vulcolutre* de volcan de boue Carlos Ribeiro (2200m de profondeur) dans le golfe de Cadiz. Source : Oliver *et al.*, 2011 29
Figure 2-7 : *Isorropodon perplexum* provenant du volcan de boue Captain Arutyunov (1300m de profondeur) dans le golfe de Cadiz. Source : Oliver *et al.*, 2011 30
Figure 2-8 : A : Une moule *Bathymodiolus puteoserpentis* du site Snake Pit (3500 m de profondeur) sur la dorsale médio-atlantique, campagne BICOSE en août 2014 (photo Kamil Szafranski) ; B : Une moule *Idas simpsoni* du Canyon Lacaze-Duthiers (520 m de profondeur) dans la Méditerranée ouest (photo Sven Laming). 31
Figure 2-9 : Diagramme présentant l'évolution de l'association symbiotique entre les bactéries et les bivalves de la famille des Thyasiridae : a) les symbiontes extracellulaires (ectosymbiontes) localisés entre les microvillosités des bactériocytes, b) les symbiontes extracellulaires (ectosymbiontes) insérés dans l'espace entre la membrane cellulaire (m) et les micovillosités (mv), c) les symbiontes intracellulaires (endosymbiontes), enfermés dans le vacuole (v). Source : Dufour, 2005 33
Figure 2-10 : Un exemple des relations phylogénétiques entre les symbiontes de deux familles de bivalves (Bathymodiolinae sur l'arbre de gauche et Vesicomyidae sur l'arbre de droite). Les arbres phylogénétiques des symbiontes ont été construits sur la base des séquences 16S de l'ARNr. Les symbiontes du même groupe que les hôtes sont marqués de la même couleur, tandis que les bactéries libres sont en jaune. Source : Dubilier *et al.*, 2008 35
Figure 2-11 : A: photo au microscope confocal de bactéries symbiotiques dans les filaments branchiaux de *Bathymodiolus azoricus*. Section transversale avec les bactéries sulfo-oxydantes colorées en rouge et les méthanotrophes en vert (photo Kamil Szafranski et Bérénice Piquet) ; B : Photo au microscope électronique à transmission de bactéries sulfo-oxydantes (flèches noires) et méthanotrophes dans les mêmes vacuoles des bactériocytes de *Bathymodiolus azoricus*. Source : Fiala-Medioni *et al.*, 2002 38
Figure 3-1 : Les voies de la transmission des bactéries symbiotiques : a) horizontale; b) verticale; c) mixte. Source : Bright and Bulgheresi, 2010 42
Figure 3-2 : Les relations phylogénétiques entre les symbiontes sulfo-oxydants et les moules de la sous-famille des Bathymodiolinae. Les symbiontes et leurs hôtes respectifs sont connectés avec les lignes en pointillé. L'arbre phylogénétique des symbiontes a été construit sur la base des séquences 16S de l'ARNr, celui des hôtes s'appuie sur les séquences des gènes ND4, COI et 28S ARNr. Source : Won *et al.*, 2008 45
Figure 3-3 : Stratégies de la dispersion larvaire et bactérienne. 1 – des symbiontes transmis verticalement (bactérie rouge), 2 – des symbiontes acquis à partir de la population des formes libres de l'environnement d'origine (2a – bactérie verte) ou dans l'habitat définitif (2b – bactérie jaune), 3 – des symbiontes acquis latéralement à partir d'un autre hôte dans l'habitat d'origine (3a – bactérie noire) ou définitif (bactérie rouge) ; les situations 1, 2a et 3a facilitent la co-dispersion de l'holobionte. Source : Duperron *et al.*, 2013a 48
Figure 3-4 : Schéma présentant les interactions réciproques entre des symbiontes, des hôtes aux différents stades de développement et de l'environnement, en fonction du type de transmission des bactéries symbiotiques. Les deux environnements sont séparés par une ligne en pointillé. Les deux populations d'animaux sont marquées en vert et gris ; les cercles représentent des ovocytes ; les formes avec les flagelles représentent des spérmatozoïdes ; les triangles – des larves ; les octogones – des stades juvéniles ; les rectangles arrondis – des formes adultes d'âge différent. Les bactéries (symbiontes) méthanotrophes de deux environnements sont représentées par les ellipses bleues et jaunes ; les bactéries (symbiontes) sulfo-oxydant(e)s par les ellipses rouges et roses A – acquisition des symbiontes par l'environnement, R – relargage des symbiontes par des hôtes vers l'environnement, TL – transfert latéral des symbiontes entre deux hôtes, CL – connectivité larvaire entre deux habitats, CB – connectivité bactérienne entre deux habitats. Source : Figure originale 49

Figure 3-5 : Les stratégies de dispersion des larves des bivalves ; des larves planctotrophes sont capables de traverser de longues distances dans la zone photique (1) ou pélagique démersale (2) ; des larves lécithotrophes riches en vitellus se nourrissant sur les réserves maternelles et (3) et théoriquement parcourent des distances plus courtes que les larves planctotrophes qui se nourrissent et augmentent de taille pendant la dispersion. Source : Duperron *et al.*, 2013a 52
Figure 3-6 : Schéma de l'exploitation des ressources minérales marines profondes. Le minerai est extrait (1) et remonté (2) à bord du navire, avant d'être séparé (3) de l'eau qui est rejetée au fond (4a) ou en surface (4b) induisant des panaches, le minerai est ensuite transporté (5) à terre. Source : ESCo, 2014 55
Figure 4-1 : Schéma de la Figure 3-4 modifié présentant les interactions réciproques entre des symbiontes, des hôtes aux différents stades de développement et de l'environnement, et les questions posées dans cette thèse. Une ellipse violette se réfère aux questions du chapitre 4.1 ; une ellipse bleue – chapitre 4.2 et orange – chapitre 4.3. Plus de détails dans la légende de la Figure 3-4. Source : Figure originale 58
Figure 5-1: Figure 1: Composition of bacterial communities at the division or sub-division level based the on V5-V6 region of 16S rDNA gene sequences (OTU identity threshold at 97%). Please refer to Table 5-1 for sample IDs. Abundances are indicated as percentage of total sequences in each sample (numbers close to sample ID's). 88
Figure 5-2: Figure 2: Percentage of pyrosequencing reads representing the most abundant OTUs (more than 1% of the total number of sequences, i.e. > 3000 reads) and assigned to different bacterial phylotypes. Taxonomic classification was based on comparison of sequences within the SILVA database with OTU identity threshold at 97%. More details on taxonomic assignment of OTU analyzed are provided in Table S3. Refer to Table 5-1 for sample ID. 89
Figure 5-3: Figure 3: Dendrogram for average agglomerative clustering generated in R (R Development Core Team, 2013) using Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Average (UPGMA) on a Bray-Curtis distance matrix ('hclust()' function in stats package). The dendrogram is rooted on the negative alfalfa control (A00). Sample IDs are described in Table 5-1 90
Figure 5-4: Figure 4: RDA biplot of the Hellinger-transformed OTU abundance data constrained by all environmental variables, scaling 3. Substrate type (factor(SUBS)) and region (factor(REG)) were used as factors and water temperature (TEMP), depth (DEPT) and deployment time (DAYS) were used as variables into the constrained RDA, generated in R using 'rda()' and 'plot()' functions in 'vegan' package. Sample IDs and environmental variables and factors are described in Table 5-1. The influence of each variable and factor and their significance were assessed using ANOVA permutation tests – details in Table S4. 91
Figure 5-5: Figure S1A: Rarefaction analysis for the alfalfa grass (A) samples. The curves were generated for 97% levels of OTU using Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Sample IDs are described in Table 1. 97
Figure 5-6: Figure S1B: Rarefaction analysis for the pine wood (B) samples. The curves were generated for 97% levels of OTU using Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Sample IDs are described in Table 1. 98
Figure 5-7: Figure S2: NMDS biplot of a Bray–Curtis dissimilarity matrix of the OTU abundance data generated in R (R Development Core Team, 2013) using 'metaMDS()' and 'plot()' functions in MASS package. Sample data has been added using weighted averages. The short-term samples and the negative control are far from the long-term samples (green ellipse), the latter forming two cloud-like groups. Along the horizontal axis (NMDS1), long-term samples are roughly separated by substrate type, with alfalfa on the right and wood on the left (blue ellipse). The vertical axis displays a clear separation between samples from GoC

and EM (red ellipse) and samples from MAR and HMMV (upper part), with the alfalfa sample from L-S (A08) in between. Sample IDs are described in Table 1..... 99
Figure 5-8: Figure S3: Phylogenetic tree based on sequences of V5-V6 hypervariable region of 16S rDNA gene obtained from the 'potential symbiont' dataset and on respective sequences of known symbionts in public database. Phylogenetic relationships among sequences were estimated with MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) from a 250-bp ClustalX alignment (Larkin *et al.*, 2007) using distance methods and neighbor-joining. Bootstrap values were computed on 1,000 replicates. Each OTU is represented by sample ID followed by representative OTU number and total number of sequences in the respective OTU. Reference sequences from public database are represented by the accession number followed by the strain name. Based on the tree, OTUs related to environmental sequences were considered as doubtful candidates were not used for further analysis. 100
Figure 6-1 : Couverture du journal scientifique « Naturwissenschaften » avec une microphotographie d'une coupe transversale d'un acinus femelle d'*Isorropodon bigoti* (Bivalves, Vesicomyidae) contenant des gamètes à des étapes différents d'ovogenèse, dès les cellules gérminales (en bas à gauche) jusqu'aux ovocytes en vitellogenèse (en haut). Les points jaunes représentent les bactéries symbiotiques transmises verticalement, visualisées à l'aide d'une sonde fluorescente spécifique par la technique de FISH..... 109
Figure 6-2: Figure S1: Transmission electron micrographs of *Isorropodon bigoti* ovary tissues. **A** Cross-section through the vitellogenic oocyte cytoplasm containing electron-lucent vesicles Yolk granules (y). **B** Details of the mature oocyte's ultrastructure: Yolk granules (y), electron lucent vesicles (v) and the microvilli (black arrow) projections in the outer membrane oocyte. **C** Cloud-like granules (Balbiani bodies) in the ooplasm of mature oocyte. **D-F** Transmission electron micrographs of mitochondria (m) in Isorropodon bigoti gametes: **D** Mitochondria in the germ cell. **E** Degenerating mitochondria in vitellogenic oocytes. **F** Degenerated mitochondrium in exocytosis in mature oocyte. Source :(Szafranski *et al.*, 2014) 122
Figure 6-3 : A : Photo au microscope à fluorescence des filaments de branchie d'*Idas modiolaeformis*. En bleu les noyaux colorés en DAPI, en jaune le signal de la sonde fluorescente IMedT2 spécifique des symbiontes méthanotrophes des Mytilidae. B : Photo au microscope confocal des filaments de branchie de *Thyasira* sp. En bleu les noyaux colorés en DAPI, en jaune le signal des sondes fluorescentes GAM42 et EUB338 révélant des symbiontes de *Thyasira* sp. Source : figure originale 124
Figure 6-4 : Photo au microscope à fluorescence de la gonade femelle d'*Idas modiolaeformis*. En bleu les noyaux colorés en DAPI, le signal de la sonde fluorescente IMedT2 spécifique des symbiontes méthanotrophes des Mytilidae est absent. Source : figure originale..... 125
Figure 6-5 : Photo au microscope confocal de la gonade femelle de *Thyasira* sp. En bleu les noyaux colorés en DAPI, en jaune le signal des sondes fluorescentes GAM42 et EUB338 révélant des symbiontes de *Thyasira* sp au niveau de l'epithélium (flèche blanche). Le signal spécifique des symbiontes n'est pas détecté dans les gamètes. Source : figure originale..... 125
Figure 7-1: Figure 1: Fluorescence *in situ* hybridization of symbiotic bacteria on transverse section of gill filament from *Bathymodiolus azoricus* mussel. Sulfur-oxidizers appear in blue, methanotrophs in green, the area of all bacteria is enclosed by red line. 148
Figure 7-2: Figure 2: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs in bacteriocytes of gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels, recovered in BioBoxes and PERISCOP from Menez Gwen and Rainbow sites. Values were measured with 2D and 3D FISH techniques and with 3D image of 10 randomly extracted bacteriocytes. 148
Figure 7-3: Figure 3: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs in bacteriocytes of gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels, recovered in

PERISCOP from Lucky Strike site. Values were measured with 2D FISH after the heat-shock experiment. 149
Figure 7-4: Figure 4: The mean percentage of the volume occupied by thiotrophs in bacteriocytes of gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels, recovered in PERISCOP from Rainbow sites. Values were measured with 2D and 3D FISH techniques after chemical stress experiments. 149
Figure 7-5: Figure 5: The comparison of the respective values obtained with two methods of bacterial quantification (3D FISH and 454 pyrosequencing). The regression line was calculated ($f(x)=1.94x-88.58$) with $R^2=0.69$ 150

Table des tableaux

Tableau 1-1 : Paramètres physiques (la température et le pH) et composition chimique des fluides de différents sites, des fluides influencés par une couche epaisse du sédiment (Sediment-Hosted) et de l'eau de mer (seawater). Source : Tivey, 2007..... 7
Tableau 5-1: Table 1: Main characteristics of samples used for sequence analyses. Environmental data for each site were used in redundancy analysis (RDA). 93
Tableau 5-2: Table 2: Species richness and diversity indices calculated for each sample in Mothur (Schloss *et al.*, 2009) for sequences with OTU identity threshold at 97%. Sample IDs are described in Table 1. 94
Tableau 5-3: Table 3: Symbionts and animal hosts occurrence in geographical regions analyzed in this study. Symbiont occurrence is a synthesis of data from Table S5, host occurrence is based on available literature study. Sample IDs are described in Table 1..... 95
Tableau 5-4: Table S1: Detailed distribution of sequencing data in datasets used in this study. Refer to Table 1 for sample ID..... 102
Tableau 5-5: Table S2: The total number of V5-V6 sequences at OTU identity threshold of 97% in each bacterial division or sub-division and relative percentage in total effective bacterial sequences per sample. Refer to Table 1 for sample ID. 103
Tableau 5-6: Table S3: The total number of V5-V6 sequences at OTU identity threshold of 97% in the most abundant OTUs, represented by more than 1% of the total number of sequences in the dataset (> 3000 amplicons). OTUs were assigned to different bacterial phylotypes by Blast on SILVA 115 database with OTU identity threshold at 97%. The relative percentage was normalized by the total number of the most abundant bacterial sequences per site. Refer to Table 1 for sample ID..... 104
Tableau 5-7: Table S4: Estimation of the influence of each variable and factor and their respective significance in redundancy analysis (RDA), assessed using ANOVA permutation tests in R (R Development Core Team, 2013). Sample IDs are described in Table 1. 106
Tableau 5-8: Table S5: The total number of sequences of symbiont-related OTUs identified by the 'symbio' key word in at least one of their four best BLAST hit definitions and confirmed by the phylogenetic proximity. Only OTUs displaying a symbiont sequence as their closest relative on the phylogenetic tree were retained. Sample IDs are described in Table 1..... 107
Tableau 7-1: Table 1: Details on sampling sites (depth and geographical position), recovery mode and number of specimens analysed in all experiments. 152
Tableau 7-2: Table 2: Details on probes used in FISH experiments (sequence and fluorochrome attached) and their respective false colors on images acquired on epifluorescence microscope. 152
Tableau 7-3: Table 3: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs (MOX) and sulfur-oxidizers (SOX) in bacteriocytes of the anterior gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels recovered in BioBoxes and PERISCOP from Menez Gwen and Rainbow sites. Values were measured with 2D and 3D FISH techniques and with 3D image of 10 randomly extracted bacteriocytes..... 153
Tableau 7-4: Table 4: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs (MOX) and sulfur-oxidizers (SOX) in bacteriocytes of the posterior gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels recovered in BioBoxes and PERISCOP from Menez Gwen and Rainbow sites. Values were measured with 2D and 3D FISH techniques. 153
Tableau 7-5: Table 5: Statistical estimation of the influence of various factors on the relative abundances of symbionts in all samples analysed, and their respective significance in

redundancy analysis (RDA), assessed using ANOVA permutation tests in R (R Development Core Team, 2013). Factors: SITE – site; REC – recovery type; METH – acquisition method; GILL – gill region; IND – specimen. 154
Tableau 7-6: Table 6: The mean percentage of the volume occupied by methanotrophs (MOX) and sulfur-oxidizers (SOX) in bacteriocytes of the anterior gill filaments from *Bathymodiolus azoricus* mussels recovered in PERISCOP and subjected to the heat-shock experiment (mussels from Lucky Srtike) and chemical stress experiment (mussels from Rainbow). Values were measured with 2D and 3D FISH techniques (chemical stress) or with 2D FISH only (heat-shock). 154
Tableau 7-7: Table 7: Statistical estimation of the influence of various factors on the relative abundances of symbionts exposed to chemical stress, and their respective significance in redundancy analysis (RDA), assessed using ANOVA permutation tests in R (R Development Core Team, 2013). Factors: TREAT – chemical treatment; METH – acquisition method; IND – specimen. 155
Tableau 7-8: Table 8: The total number of V5-V6 sequences in OTUs, represented by more than 5 sequences in the dataset. OTUs were assigned to different bacterial phylotypes by Blast on SILVA 115 database with OTU identity threshold at 97%. The relative percentage of SOX, MOX and other bacterial sequences was normalized by the total number of sequences per sample..... 156

Résumé :
De nombreuses bactéries entrent en symbiose avec les métazoaires colonisant les habitats à base chimiosynthétique dans l'océan profond. Les hôtes auxquels elles apportent le carbone organique deviennent ainsi dépendants des bactéries sulfo-oxydantes et/ou méthanotrophes. Pour assurer la continuité de ces associations et la colonisation de nouveaux sites, des stratégies diverses de dispersion ont été développées par les animaux. Deux types de transmission des bactéries symbiotiques existent : la transmission verticale où elles sont transmises *via* les gamètes, et la transmission horizontale où elles sont acquises à partir de l'environnement, depuis des populations de bactéries libres ou relarguées par d'autres hôtes. Cette thèse vise à répondre à des questions concernant les cycles de vie des symbiontes.
La diversité et la distribution des formes libres de symbiontes et des bactéries apparentées dans plusieurs habitats réduits ont été étudiées par l'analyse des séquences de l'ARNr 16S des bactéries colonisant des substrats organiques déployés dans l'Atlantique et la Méditerranée. La transmission maternelle des symbiontes chez le bivalve vésicomyidé *Isorropodon bigoti* du golfe de Guinée a été confirmée par l'observation et l'identification des symbiontes dans les ovocytes et dans les stades post-larvaires. Enfin, l'effet des stress chimique, thermique et de la remontée sur la dynamique des populations de symbiontes sulfo-oxydants et méthanotrophes chez la moule *Bathymodiolus azoricus* a été analysé par les techniques de FISH 3D et de pyroséquençage. Cette thèse a permis de mieux comprendre des cycles de vie des bactéries symbiotiques dans et en dehors de leur hôtes animaux.

Mots clés : symbiose ; transmission des symbiontes ; sources hydrothermales ; suintements froids ; débris organiques ; formes libres des symbiontes ; cycles de vie des symbiontes

Aspects of the life cycles of chemosynthetic bacterial symbionts associated with bivalves from deep-sea chemosynthesis-based ecosystems

Abstract:
Metazoans colonizing deep-sea reducing habitats often employ chemosymbiotic bacterial associations. Hosts become dependent upon their sulfur-oxidizing and/or methanotrophic symbionts, which provide organic carbon compounds. Various larval dispersal strategies have evolved in the hosts, ensuring the colonization of new sites. The continuity of the symbiotic association is maintained by symbiont transmission. Symbionts may pass directly to the host's progeny *via* gametes (vertical transmission) or may be acquired from the environment as free-living forms or as those released from other hosts (horizontal transmission). This work answers several questions about the lifecycles of symbionts regarding the diversity of symbiont-related bacteria in environmental bacterial communities; the localization and dynamics of symbionts in host tissues depending on their transmission mode; or after abiotic stresses applied to the holobiont.
The diversity and the distribution of free-living symbionts and their close relatives from several chemosynthesis-based habitats has been analysed by 454 pyrosequencing of the 16S rRNA of bacteria colonizing plant-derived substrates in the Northern Atlantic and Mediterranean. The trans-ovarial transmission has been detailed in the clam *Isorropodon bigoti* by the identification of symbionts within oocytes and in the forming gills of their post-larvae. Finally, the influence of several abiotic stresses in *Bathymodiolus azoricus* mussels on the dynamics of their symbionts has been investigated by FISH and pyrosequencing. This PhD presents new data regarding various aspects of the life cycle of chemosynthetic symbionts inside and outside their metazoan hosts.

Keywords: symbiosis; symbiont transmission; hydrothermal vents; cold seeps; organic falls; free-living forms of symbionts; symbionts life cycle