

# Sorbonne Université

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

*UMR 7208 BOREA (MNHN, Sorbonne Université, CNRS, IRD, UCN, UA)*

*Equipe Adaptation aux Milieux Extrêmes (AMEX)*

Station Biologique de Roscoff

*UMR 7144 AD2M (CNRS, Sorbonne Université)*

*Equipe Adaptation et Biologie des Invertébrés en Conditions Extrêmes (ABICE)*

## **La flexibilité des symbioses entre bivalves et bactéries chimiotrophes : mécanismes, régulation et résilience**

Par Bérénice Piquet

Thèse de doctorat en Biologie des organismes

Dirigée par Sébastien Duperron et Ann C. Andersen

Présentée et soutenue publiquement le 23 Octobre 2018

Devant un jury composé de :

Pr. Patrick CORMIER, Sorbonne Université, Station Biologique de Roscoff	Président du jury
Dr. Marie Anne CAMBON-BONAVITA, IFREMER, Plouzané	Rapporteuse
Dr. Sophie GAUDRIault, Université de Montpellier	Rapporteuse
Pr. Marc-André SELOSSE, MNHN, Paris	Examinateur
Pr. Paola FURLA, Université Nice Sophia Antipolis	Examinatrice
Dr. Natacha KREMER, CNRS, Lyon	Examinatrice
Dr. Ann ANDERSEN, Sorbonne Université, Station Biologique de Roscoff	Co-encadrante de thèse
Pr. Sébastien DUPERRON, MNHN, Paris	Co-encadrant de thèse





Dessin de Magot Tragin

*Dédicace*

*A ma mère qui m'a toujours encouragé à suivre mes passions*

*Et à mon François qui les partage.*

# Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier mes deux directeurs de thèse : Ann Andersen et Sébastien Duperron. Merci d'avoir été l'équipe d'encadrants de thèse en parfaite symbiose. Cela a été une chance incroyable d'avoir été encadrée par vous deux ! Merci d'avoir supporté mes « Au fait, j'ai une petite question ! » qui se finissait invariablement par une longue conversation. Merci de m'avoir soutenue et poussée à faire des choses dont je me pensais incapable. J'ai énormément grandi pendant ces 3 années de thèse grâce à vous. Merci d'être si complémentaire et de votre si bonne entente entre vous deux.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury et en particulier les rapporteuses qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je voulais particulièrement remercier les membres du comité de suivi de thèse (Paola Furla, Natacha Kermer, Catherine Leblanc et Arnaud Tanguy) pour tous leurs conseils pendant mais aussi en dehors des réunions du comité. Vous avez tous pris votre rôle à cœur.

Merci à mes deux directeurs d'UMR, Sylvie Dufour et François Lallier. Malgré votre emploi du temps chargé, vous avez consacré tous les deux du temps pour venir prendre des nouvelles de moi et de ma thèse.

Merci à la Région Bretagne, UPMC/SU et à l'IUF d'avoir financé cette thèse (salaire et matériel).

Cette thèse s'est déroulée entre deux villes Paris et Roscoff ; et donc entre deux équipes.

Merci à l'équipe AMEX (Bruce, Juliette, Magali, Julia, Louis et Nelly) de m'avoir accueilli. Merci pour toutes ces conversations autour de la science et de la politique (et bon aussi beaucoup de foot ...) pendant les repas. Merci en particulier à Bruce pour les manips réalisées dans IPOCAMP/PERISCOP/BALIST. Merci à Magali de m'avoir initié à la microscopie électronique. Merci à Magali et Julia pour les manips que vous avez réalisées pour moi lors de la campagne BICOSE 2. Merci à Nelly pour les manips d'extraction d'ADN mais merci surtout pour ton soutien, les conversations et les massages !

Merci à l'équipe ABICE (François, Stéphane, Didier, Jean, Arnaud, Jean-Yves, Isabelle, Stéphanie et Anne-Sophie). Merci pour vos conseils et d'avoir été présent quand j'en avais besoin. Merci en particulier à Arnaud, Anne-Sophie et Stéphanie de m'avoir encadré et enseigné les PCR, les RTqPCR et les extractions d'ADN et d'ARN. Merci à Thierry pour ses conseils sur les bathymodiales.

Et merci à l'équipe CCE Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement (UMR MCAM MNHN) de m'avoir accueilli si chaleureusement et de m'avoir si rapidement fait une place lors de l'arrivée de Sébastien dans l'équipe.

Merci à Paola et à son équipe en particulier Cédric de m'avoir accueilli dans votre équipe pour une semaine de manip et de partage. Merci Paola de m'avoir consacré tout ce temps, cela m'a touché.

Merci à mes 3 stagiaires : Antoine, Myriam et Coralie. Merci pour votre contribution à cette thèse. Vous ne vous en rendez pas compte mais merci de m'avoir aussi fait grandir comme chercheuse pendant vos stages. Car être chercheur, c'est aussi transmettre son savoir et encadrer des étudiants. Et merci aux autres doctorants de Roscoff : Camille Détrée, Gonzalo, Alexis, Perrine, Camille Thomas-Bulle et Victor. Merci d'avoir rendu le bureau des étudiants si agréable, tant par les conversations que par les plantes et les aquariums. On peut le dire, nous avons le bureau le plus cool de toute la station.

Mais aussi à la seule doctorante (avec moi) de Paris, Julia. Merci pour nos conversations, nos inquiétudes partagées sur notre avenir et la chasse aux limules !

Merci à l'équipe du RAS, en particulier à Gaëtan et Ronan pour tout l'amour et les microalgues que vous avez donné aux bathymodiales.

Merci à Arunima pour tous ces échanges sur le monde après la thèse et pour les spécialités norvégiennes.

Merci à Collen Cavanaugh de m'avoir invité dans son équipe afin de présenter et de discuter de mes résultats.

Merci Agnès Boutet pour tes conseils et ton réconfort lors des manip de révélation du BrdU.

Un remerciement particulier pour Kamil, mon prédécesseur. Merci pour les manip que tu as effectué pendant les campagnes et qui ont servi dans cette thèse. Merci pour m'avoir guidé lors du traitement et des analyses des séquences. Merci pour tous les bons moments passés ensemble et tu as presque raison : Sébastien est le meilleur encadrant de thèse mais le couple d'encadrants Ann/Sébastien est encore meilleur.

Merci à Sophie de la plateforme Merimage de Roscoff tant pour l'aide en microscopie que pour les conversations.

Merci à la plateforme de microscopie de l'IBPS et en particulier à France pour nos conversations de passionnées de microscopie à fluorescence.

Merci à Dominique Marie pour la cytométrie en flux et pour son aide.

Et d'avance merci à Pascal Riera pour les analyses des isotopes.

Je voudrais en particulier remercier François Lallier. Merci de m'avoir permis de partir en Campagne Océanographique mais aussi d'être venu me rejoindre à bord et m'avoir autant aidé. Cette campagne restera l'une des plus belles et incroyables expériences de ma vie. Merci aussi pour toutes les autres opportunités que tu m'as données.

Merci aux membres de la campagne MOMARSAT/BioBaz, aux équipes du ROV, aux marins et aux Scientifiques. Merci à nos excellents chefs de mission Pierre-Marie Sarradin et François Lallier. Et merci à Anne et Françoise pour votre aide précieuse à bord.

Merci aux membres et aux chefs des missions WACS, BioBaz 2013, BIOCOSE 1 et 2.

Merci à ma Maman qui m'a élevée seule et qui malgré tout m'a toujours encouragée à poursuivre mes rêves. Merci à ma moitié François de m'avoir supportée dans les deux sens du terme pendant cette thèse. Je vous aime !

Merci à Bob de m'avoir réconforté dans les moments de doutes.

Merci à mes amis pour leur soutien pendant cette thèse et en particulier à Adeline et Alice.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer lors de ces trois années de thèse.

Et pour finir un remerciement tout particulier pour les bathymodiales qui ont hanté mes jours et mes nuits !

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>8</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
1.1 LA SYMBIOSE.....	13
1.1.1 Définition de la symbiose.....	13
1.1.2 La rencontre entre les partenaires ou l'acquisition des symbiotes.....	17
1.1.3 Diversité des structures accueillant les symbiotes et processus de la mise en place de la symbiose.....	20
1.1.4 La flexibilité de la symbiose ; un élément important de son bon fonctionnement .....	22
1.1.5 Les mécanismes impliqués dans la régulation de la symbiose et leur mise en évidence.....	28
1.2 LES BATHYMODIOLES ET LEURS ENVIRONNEMENTS EXTREMES .....	48
1.2.1 Les milieux de vie des bathymodioles .....	48
1.2.2 Les bathymodioles et leurs symbioses diverses et flexibles : des organismes modèles.....	54
1.2.3 Structure et nomenclature de l'organe abritant les symbiotes.....	59
1.2.4 Nutrition et symbiose chez les bathymodioles du genre <i>Bathymodiolus</i> .....	61
1.2.5 La mise en place de la symbiose chez les bathymodioles.....	62
1.2.6 Identité, diversité et métabolisme des symbiotes .....	63
1.2.7 Flexibilité de la symbiose ou des concentrations en symbiotes variant avec la disponibilité de leurs substrats .....	65
<b>2 OBJECTIFS ET APPROCHES METHODOLOGIQUES DE L'ETUDE.....</b>	<b>68</b>
2.1 OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	68
2.2 APPROCHE METHODOLOGIQUES : DES EXPERIMENTATIONS <i>IN VIVO</i> EN AQUARIUMS PRESSURISES AUX EXPERIMENTATIONS A TERRE. ....	71
2.2.1 Expériences lors de Campagnes Océanographiques.....	73
2.2.2 Expériences et maintenance de <i>Bathymodiolus azoricus</i> et <i>Mytilus edulis</i> à Roscoff.....	77
2.3 PREPARATION DES TISSUS POUR LA MICROSCOPIE.....	78
2.3.1 Fixation, inclusion et préparation des échantillons pour la microscopie à fluorescence .....	78
2.3.2 Fixation, inclusion et préparation des échantillons pour la microscopie à électronique à transmission (MET) .....	80
<b>3 COMMENT AUGMENTER LA QUANTITE DE SYMBIOTES ?.....</b>	<b>82</b>
3.1 MULTIPLICATION DES CELLULES BRANCHIALES DE L'HOTE.....	82
3.1.1 Mise en évidence des bactériocytes en cours de mitose par immunolocalisation de la phospho-histone H3, un marqueur de la mitose chez les eucaryotes.....	82
3.1.2 Suivi intégré de la dynamique des cellules de l'épithélium branchial de bathymodioles par marquage BrdU lors d'expérimentations .....	89
3.1.3 Suivi intégré de la dynamique des cellules de l'épithélium branchial de bathymodioles par marquage EdU .....	97

3.2	MULTIPLICATION DES BACTERIES ENDOSYMBIOTIQUES .....	108
3.2.1	<i>Observation de la multiplication bactérienne par immunohistochimie d'un marqueur de la division bactérienne, FtsZ et au microscope électronique à transmission (MET) .....</i>	108
3.3	ENDOCYTOSE DE BACTERIES ENVIRONNEMENTALES .....	113
<b>4</b>	<b>COMMENT DIMINUER LA QUANTITE DE SYMBIOTES ? .....</b>	<b>115</b>
4.1	L'APOPTOSE DANS LES BRANCHIES DES BATHYMODIOLES .....	115
4.1.1	<i>Article: High rates of apoptosis visualized in the symbiont-bearing gills of deep-sea Bathymodiolus mussels</i> 115	
4.2	LE RELARGAGE DES SYMBIOTES CHEZ LES BATHYMODIOLES .....	152
4.2.1	<i>Article 2 : Preliminary evidence for the existence of symbiont release in deep-sea hydrothermal vent mussels</i> 152	
4.2.2	<i>Relargage des symbiotes lors de stress thermiques et lors de la mort de l'hôte</i> .....	179
4.3	SUIVI DE LA PERTE DES SYMBIOTES ET MISE EN PLACE DE LA BRANCHE APOSYMBIOTIQUE .....	188
<b>5</b>	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>202</b>
5.1	APOPTOSE ET MULTIPLICATION, UNE ZONE FRONTALE CILIEE TRES DYNAMIQUE .....	204
5.2	LA DYNAMIQUE CELLULAIRE DES BACTERIOCYTES .....	207
5.3	LE RELARGAGE ET L'ENDOCYTOSE, DEUX MECANISMES QUI PERMETTRAIENT UNE TRANSMISSION LATERALE DES SYMBIOTES	209
5.4	UNE POLARITE APICO-BASALE DANS LE BACTERIOCYTE, ENTRE ACQUISITION, MULTIPLICATION ET DIGESTION DES SYMBIOTES .....	211
5.5	JEUNE, PERTE DES SYMBIOTES ET RESILIENCE DE LA BRANCHE DES BATHYMODIOLES.....	212
5.6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	213
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>217</b>
<b>7</b>	<b>ANNEXES .....</b>	<b>234</b>
7.1	MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE MAINTENANCE DE <i>BATHYMODIOLUS AZORICUS</i> SANS SYMBIOTES A LONG TERME	234
	<b>TAUX DE FILTRATION DES MICROALGUES .....</b>	<b>234</b>
7.2	COLLABORATIONS DURANT LA THESE .....	240
7.2.1	<i>Etude de l'expression de gènes codant pour l'apoptose chez Bathymodiolus aff. boomerang des suintements froids en collaboration avec Arnaud Tanguy. ....</i>	240
7.2.1	<i>Contribution au projet SIBO .....</i>	241
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>242</b>
7.3	ARTICLE MASTER 2 : RELATIVE ABUNDANCES OF METHANE- AND SULFUR-OXIDIZING SYMBIONTS IN GILLS OF THE DEEP-SEA HYDROTHERMAL VENT MUSSEL <i>BATHYMODIOLUS AZORICUS</i> UNDER PRESSURE.....	244
7.4	COMMUNICATIONS EFFECTUEE DURANT LA THESE.....	252
7.4.1	<i>Posters : .....</i>	252
7.4.2	<i>Oraux : .....</i>	252
7.5	ENCADREMENT DE STAGES.....	253



7.6	FORMATION DOCTORALE .....	253
7.6.1	<i>Module insertion professionnelle</i> .....	253
7.6.2	<i>Modules techniques et d'ouvertures</i> .....	253
<b>8</b>	<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>253</b>
<b>9</b>	<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>263</b>

# Liste des Abréviations

- ABICE** : Adaptation et Biologie des Invertébrés en Conditions Extrêmes
- AD2M** : Adaptation et Diversité en Milieu Marin
- ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- AIF** : Apoptosis Inducing Factor
- AMEX** : Adaptation aux Milieux EXtrêmes
- Apaf-1** : Apoptose protease-activating factor-1
- ARN** : Acide RiboNucléique
- ARNr** : Acide ribonucléique ribosomal
- ATP** : Adénine TriphosPhate
- BALIST** : Biology of *Alvinella* : Isobaric Sampling and Transfer
- Bax** : Bcl-2 associated X
- Bcl** : B-cell lymphoma (Bcl-2, Bcl-XL)
- BH3** : Bcl-2 Homology domain 3
- BICOSE** : Biodiversité, Interactions, COnnectivité et Symbiose en milieux Extrêmes
- BioBaz** : Biologie Intégrée de *Bathymodiolus azoricus*
- BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool
- BOREA** : Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques
- BrdU** : 5-bromo-2'-deoxyuridine ou Bromure d'uracyle
- BSA** : Bovine Serum Albumine
- Caspase** : Cysteine-**asp**artic-**pro**tease
- CCE** : Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement
- CED** : Cysteine-dependent aspartate-directed proteases
- CZ ou ZC** : Zone Ciliée
- DAPI** : 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DFF** : DNA-Fragmentation Factor
- DOPA** : Dihydroxyphénylalanine
- dUTP** : DeoxyUridine TriPhosphate
- EDMF** : Eau De Mer Filtrée
- EDTA** : Ethylène Diamine Tétra-Acétique
- EdU** : 5-Ethynyl-2'-deoxyUridine
- Egl-1** : Egg-laying defective

**ER ou RE** : Endoplasmic Reticulum ou Reticulum Endoplasmique

**FADD** : FAs-associated protein with Death Domain

**FISH** : Fluorescence *In Situ* hybridization (Hybridation *in situ* en fluorescence)

**FITC** : Isothiocyanate de Fluorescéine

**FtsA** : Filamentous Temperature Sensitive A (ATP-hydroxylase)

**FtsI** : Filamentous Temperature Sensitive I

**FtsK** : Filamentous Temperature Sensitive mutant K

**FtsZ** : Filamentous Temperature Sensitive mutant Z

**GC** : Cellule à grain

**H** : Hémolymphe

**IAP** : Inhibitor of Apoptosis Protein

**IF** : Zone de jonction InterFilamentaire

**IPOCAMP** : Incubateur Pressurisé pour l'Observation et la Culture d'Animaux Marins Profonds

**MAR** : Mid Atlantic Ridge

**MCAM** : Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes

**MCF-7** : Lignée de cellule tumorale

**MET** : Microscopie Electronique à Transmission

**MLKL** : Mixed Lineage Kinase Like

**MOMARSAT** : Monitoring the Mid-Atlantic Ridge

**MOX** : Bactérie méthanotrophe

**MPT** : Mitochondrial Permeability Transition

**N/O** : Navire Océanographique

**NET** : Neutrophil Extracellular Trap

**nMDS** : non-metric multidimensional scaling

**OTUs** : Operational Taxonomic Units

**PAS** : Pre-Autophagosomal Structure

**PBP3** : Penicillin-Binding Protein 3

**PBS** : Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin

**PBT** : PBS + Tween 20

**PCR** : Polymerase Chain Reaction ou amplification en chaine par polymerase

**PEG** : Poly Ethylène Glycol distearate

**PERISCOP** : Projet d'Enceinte de Remontée Isobare Servant la Capture d'Organismes

Profonds

**PFA** : ParaFormAldehyde

**PH3** : Phospo-Histone H3

**Phe** : Phénylalanine

**PI** : Iodure de Propidium

**pI** : Potentiel ionique

**PRD** : Pressurized Recovery Device

**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction ou amplification quantitative en chaine par polymerase

**RAS** : Roscoff Aquarium Service

**RIPK3** : Receptor Interacting Protein Kinase-2

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**ROV** : Remotely Operated Vehicle

**RT-qPCR** : Quantitative Reverse Transcription PCR

**rTdT** : Terminal deoxynucleotidyl Transferase

**SBR** : Station Biologique de Roscoff

**SDS** : Sodium Dodécyl-Sulfate

**SFS** : Sterile-Filtered Seawater

**SMAC/DIABLO** : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct Inhibitor of Apoptosis protein Binding protein with LOW pI

**SOX** : Bactérie sulfo-oxydante

**TB** : Tissu Bride (pont tissulaire)

**TC** : Terminaison Ciliée

**TNF** : Tumor Necrosis Factor

**TOR** : Target of Rapamycin

**TRADD** : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein

**TUNEL** : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

**Tyr** : Tyrosine

**WACS** : West Africa Cold Seeps

**ZB** : Zone des Bactériocytes

# Avant-Propos

Les bathymodiales sont des mollusques bivalves de la famille des Mytilidae appartenant à la sous-famille des Bathymodiolinae, des moules spécialisées dans les habitats marins profonds (de 150 à 6000 mètres), en particulier les sources hydrothermales et les suintements froids. Elles vivent dans des environnements qui subissent des variations qui peuvent être temporaires (changement de l'orientation ou de la composition du fluide) ou plus durables (extinction ou création d'une nouvelle cheminée ou source de fluide). C'est grâce à la symbiose nutritionnelle avec un ou plusieurs types de bactéries chimiotrophes que les bathymodiales dominent la faune des sources hydrothermales et des suintements froids. Les moulières peuvent couvrir des surfaces de plusieurs centaines de mètres carrés avec une densité pouvant atteindre 400-700 individus par m<sup>2</sup> (Colaço et al., 1998). Les bactéries symbiotiques utilisent en effet les composés réduits présents dans les fluides comme source d'énergie pour réaliser une production primaire autochtone, qui alimente leur hôte. La densité de chacun des types de symbiotes peut changer suivant la quantité de substrat réduit disponible dans son environnement. Cette flexibilité de sa symbiose est la clé du succès des bathymodiales, contribuant à une utilisation efficace des ressources disponibles dans l'environnement. Mais peu de choses sont connues sur les mécanismes permettant à l'animal de réguler sa quantité de symbiotes. Quels sont les mécanismes qui permettent d'ajuster la population bactérienne ? Quelle est la dynamique cellulaire de la branchie, organe qui accueille les symbiotes, et comment cette dynamique intervient-elle dans la régulation de la symbiose (multiplication des cellules branchiales / apoptose) ? Quelle est la dynamique de la population bactérienne elle-même ? Quelle est la résilience de l'hôte en cas d'absence temporaire ou prolongée de composés disponibles pour ses symbiotes ?

Les travaux menés au cours de cette thèse ont pour objectif de répondre à ces questions. Des expériences ont été réalisées sur des spécimens de bathymodiales issus des sites hydrothermaux de la ride Médio-Atlantique possédant deux types de symbiotes, collectés au cours des campagnes WACS 2011, BioBaz 2013, BICOSE 2014 et MOMARSAT/BioBAZ 2017, pour examiner les questions suivantes : Comment l'hôte peut-il augmenter sa quantité de symbiotes ? Les symbiotes peuvent-ils se multiplier à l'intérieur de leur hôte ? Où sont localisées les zones de croissances de la branchie ? A l'inverse, la mort cellulaire programmée, ou apoptose, serait-elle un moyen de régulation directe de la quantité de symbiotes ? Pour réduire la quantité de bactéries rapidement, l'hôte peut-il relarguer massivement ses symbiotes dans

l'environnement ? Comment évolue la branchie quand les symbiotes se raréfient et finissent par disparaître, i.e. la branchie a-t-elle une capacité de résilience ? Pour répondre à ces questions, les individus de trois espèces de bathymodiols ont été soumis à des expériences menées en aquariums pressurisés ou non pressurisés lors des campagnes en mer, ainsi qu'à terre au Roscoff Aquarium Service (RAS) de la Station Biologique de Roscoff (SBR).

Nous nous sommes focalisés principalement sur trois espèces de Bathymodiolinae du genre *Bathymodiolus* présentes dans deux milieux différents (sources hydrothermales et suintements froids) et possédant deux types d'endosymbiotes (bactéries sulfo-oxydantes et méthanotrophes). Ces modèles simples permettent de mieux comprendre le dialogue entre l'hôte et ses symbiotes mais aussi le dialogue entre les symbiotes.

Ce manuscrit présente les résultats de ces travaux. Dans un premier chapitre les mécanismes cellulaires permettant la régulation de la symbiose sont abordés, à l'aide de six exemples de symbioses. Dans ce même chapitre, un état de l'art sur les *Bathymodiolus* est présenté. Le second chapitre présente les objectifs de la thèse et les méthodes employées pour les atteindre. Le chapitre trois présente les résultats sur les mécanismes cellulaires permettant l'augmentation de la quantité de bactéries, par la multiplication des cellules accueillant les symbiotes et la multiplication des endosymbiotes à l'intérieur de ces cellules. Le quatrième chapitre présente notre étude d'autres mécanismes cellulaires tels que l'apoptose et le relargage des bactéries dans leur environnement permettant de réduire la quantité de symbiotes de l'hôte. Enfin nous aborderons quelques étapes de la perte totale des symbiotes et la transformation de la structure cellulaire d'une branchie devenant aposymbiotique. Pour finir, un bilan des résultats et les perspectives qu'ils apportent font l'objet du chapitre cinq. Dans les annexes qui suivent sont présentés des travaux menés en parallèle de la thèse dans le cadre de collaborations.

# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 LA SYMBIOSE

« Life did not take over the globe by combat, but by networking »

« La vie n'a pas conquis le globe par le combat, mais par la mise en réseau »

Lynn Margulis

### 1.1.1 Définition de la symbiose

Dans ce travail, nous utiliserons la définition initiale proposée par Heinrich Anton de Bary en 1879, *i.e.* une interaction à long terme entre des organismes de différentes espèces sans définir si cette relation est positive ou non pour les partenaires (De Bary, 1879). L'organisme le plus grand est appelé Hôte et l'organisme le plus petit Symbiote pour plus de facilité.

Vivre en symbiose, c'est vivre ensemble, pour le meilleur et pour le pire. Cette association peut être positive pour les deux partenaires (+/+): c'est le mutualisme; néfaste pour un des partenaires et positive pour l'autre (+/-) comme le parasitisme, ou n'être bénéfique que pour un des deux partenaires sans que cela ne gêne la vie de l'autre (+/0), comme certains cas de commensalisme.

La symbiose est souvent associée au mutualisme, une relation à bénéfice réciproque. Ce terme engendre de nombreuses confusions, dues au fait de l'utilisation de ce mot pour évoquer des relations harmonieuses dans des expressions socio-culturelles. Dans la symbiose, il est souvent clair que l'association est positive pour l'un des partenaires, mais dans le cas des autres associés, cela semble parfois plus complexe à déterminer, ce qui nous conduit à retenir la définition initiale de De Bary malgré ses limites. En effet, dans le cas d'une bactérie ou d'une microalgue endocytée par son hôte et qui voit son génome réduit, le symbiote perd toute possibilité de survie à l'extérieur de l'hôte. Bien qu'ils aient le gîte et le couvert, ne sont-ils pas prisonniers de leur hôte, réduits en esclavage? L'hôte ne serait-il pas plutôt dans le rôle du parasite, qui contraint et exploite son symbiote, ainsi que le suggère Combes (Combes, 2001).

La symbiose confère à l'holobionte (entité constituée par un organisme hôte de grande taille et l'ensemble de ses symbiotes de plus petite taille) des caractéristiques nouvelles, et les rôles possibles sont multiples. La symbiose peut ainsi, par exemple, permettre de coloniser des milieux toxiques tels que des sédiments riches en sulfures (les lucines), les sources hydrothermales et les suintements froids (l'annélide *Riftia pachyptila* et les bathymodioles de notre étude), ou encore des milieux oligotrophes pauvres en nutriments (les coraux). Mais elle

peut aussi conférer une capacité donnant un avantage face à des prédateurs, comme c'est le cas avec la seiche *Euprymna scolopes* et son organe lumineux qui la dissimule aux yeux de ses prédateurs, ou du charançon et son bactériome qui lui fournit les éléments nécessaires à la formation rapide de sa cuticule protectrice (Wicker and Nardon, 1982; McFall-Ngai *et al.*, 2010). Dans le cas du microbiome humain, la symbiose confère de nombreux avantages, par exemple au niveau du tube digestif : assimilation de vitamines, protéines et autres composés, barrière empêchant la prolifération de bactéries pathogènes, éducation de notre système immunitaire, et de nombreux autres rôles encore aujourd'hui mal connus (Sekirov *et al.*, 2010). La symbiose est donc un phénomène très commun, dont l'impact sur les organismes et leur évolution est important et prend des formes multiples.

Ici, nous ne parlerons que d'interaction « intime », *i.e.* à un niveau cellulaire ou tissulaire, où l'hôte accueille le symbiote soit à la surface de la cellule (extracellulaire), soit à l'intérieur de ses cellules (intracellulaire).

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier la dynamique et la régulation de l'interaction symbiotique au niveau cellulaire du tissu qui héberge les symbiotes. Dans les chapitres suivants vont donc être développées les différentes étapes de ce « mariage », depuis la rencontre arrangée entre les partenaires ; l'installation de cette association dans des structures dédiées et leur maintenance, jusqu'à la régulation de la symbiose et le divorce parfois inévitable dans certaines circonstances. Afin d'illustrer ces étapes, nous nous appuyerons sur 6 modèles principaux. Chaque exemple a été choisi afin d'apporter un regard différent sur la régulation de la symbiose. Le microbiote humain est l'un des plus étudiés, mais l'un des plus complexes à cause de son hôte, mais aussi par la diversité de ses symbiotes. L'étude de la régulation de ce microbiote est donc complexe. Le charançon est un exemple terrestre intéressant du fait de la disparition presque totale de ses symbiotes, une fois leur rôle rempli. La sépiole, un exemple marin, voit quant à elle sa quantité de bactéries diminuer drastiquement chaque matin pour ré-augmenter dans la journée. Les coraux et les anémones sont des exemples très documentés depuis des décennies quant à leur perte de symbiotes si spectaculaire, à l'origine du phénomène de blanchissement. Quant à *Codakia*, c'est un bivalve comme l'hôte bathymodiole, qui vit dans un environnement chargé en sulfures. Pour finir, le ver *Riftia pachyptila* vit près des sources hydrothermales, tout comme les bathymodioles. Ces six exemples proviennent de milieux différents mais tous doivent réguler la quantité de symbiotes afin de maintenir un équilibre qui seul permet le bon fonctionnement de l'association (figure 1 et tableau 1) et pour les six espèces-hôtes le bénéfice semble assez clair :



Tableau 1 : Tableau résumant la symbiose chez nos 6 exemples en comparaison avec notre modèle d'étude *Bathymodiolus spp.* Les cellules de l'hôte abritant les symbiotes intracellulaires sont appelées bactériocytes.

Espèce	Rôle	Transmission	Localisation symbiote	Régulation (perte)	Régulation (augmentation)
<i>Homo sapiens</i>	digestion, immunité,...	pseudo-verticale et horizontale	extracellulaire principalement l'intestin	expulsion via les fèces	?
<i>Euprymna scolopes</i>	dissimulation vis-à-vis des prédateurs	horizontale	extracellulaire organe lumineux	expulsion de 95% des symbiotes chaque matin	multiplication des symbiotes
<i>Sitophilus</i>	fabrication cuticule	verticale	bactériome et cellules germinales	autophagie et apoptose	multiplication des symbiotes
<i>Riftia pachyptila</i>	nutrition et détoxification	horizontale	intracellulaire trophosome	digestion et apoptose ?	multiplication dans les bactériocytes
Coraux	nutrition	horizontale ou verticale selon sp	intracellulaire endoderme	apoptose, relargage et digestion	endocytose ?
<i>Codakia</i>	nutrition et détoxification	horizontale	intracellulaire branchie	digestion	endocytose
<i>Bathymodiolus spp.</i>	nutrition et détoxification	horizontale	intracellulaire branchie	digestion et autres ?	?

Le microbiote intestinal humain représente  $3,9 \cdot 10^{13}$  bactéries, soit quasiment autant que de cellules eucaryotes dans notre corps (figure 1A). Ces bactéries présentes principalement dans l'intestin fournissent à l'homme des nutriments qu'il ne peut obtenir sans leur aide, notamment certaines vitamines, et le microbiote est également impliqué dans nombre d'autres fonctions dont l'immunité notamment (Sender *et al.*, 2016).

La sépiole *Euprymna scolopes* vit en eau peu profonde au niveau de l'archipel d'Hawaï (figure 1B). Elle vit en symbiose avec une bactérie bioluminescente nommée *Aliivibrio fischeri* qu'elle accueille dans un organe lumineux dédié à la symbiose et situé dans son manteau. La seiche chasse la nuit dans des eaux peu profondes éclairées par la lune, et la lumière émise par les

bactéries lui permet de dissimuler son ombre aux prédateurs qui passeraient en-dessous (Nyholm and McFall-Ngai, 2004).

Les lucines du genre *Codakia* sont des bivalves capables de vivre dans des milieux sédimentaires riches en sulfures (herbiers) grâce à une symbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes (figure 1C). Cette symbiose leur permet de coloniser un milieu toxique (Frenkiel and Mouëza, 1995).

Le charançon *Sitophilus* dépend fortement de ses endosymbiotes *Sodalis pierantonius* pour la fabrication de sa cuticule (figure 1D). La symbiose lui permet d'accélérer la fabrication de son exosquelette à un moment où le jeune adulte est le plus vulnérable (Wicker and Nardon, 1982). Le vestimentifère *Riftia pachyptila* vit en symbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes près des sources hydrothermales de la ride Est Pacifique (figure 1E). La larve ne possède pas de symbiotes et elle a un système digestif fonctionnel. *Riftia* va perdre son système digestif lors de l'installation de ses symbiotes. L'adulte est totalement dépendant de ses symbiotes qui sont situés dans un organe spécialisé nommé « trophosome », dans le tronc de l'annélide (Nussbaumer *et al.*, 2006).

Les coraux vivent en symbiose avec des algues eucaryotes zooxanthelles du genre *Symbiodinium* (figure 1F). Les coraux et les anémones abritent des millions de *Symbiodinium* par centimètre carré de tissu. Ils arborent une couleur dorée en raison de la présence des pigments photosynthétiques des chloroplastes de leurs symbiotes. L'hôte apporte du gaz carbonique, du phosphate et de l'ammoniaque de leur excrétion. En retour, les microalgues fournissent les glucides de leur photosynthèse (Yellowlees *et al.*, 2008). Ceci compense le manque de nourriture dans la colonne d'eau, car les eaux intertropicales, où vivent les coraux, sont oligotrophes et donc pauvres en plancton, nourriture habituelle d'un cnidaire.

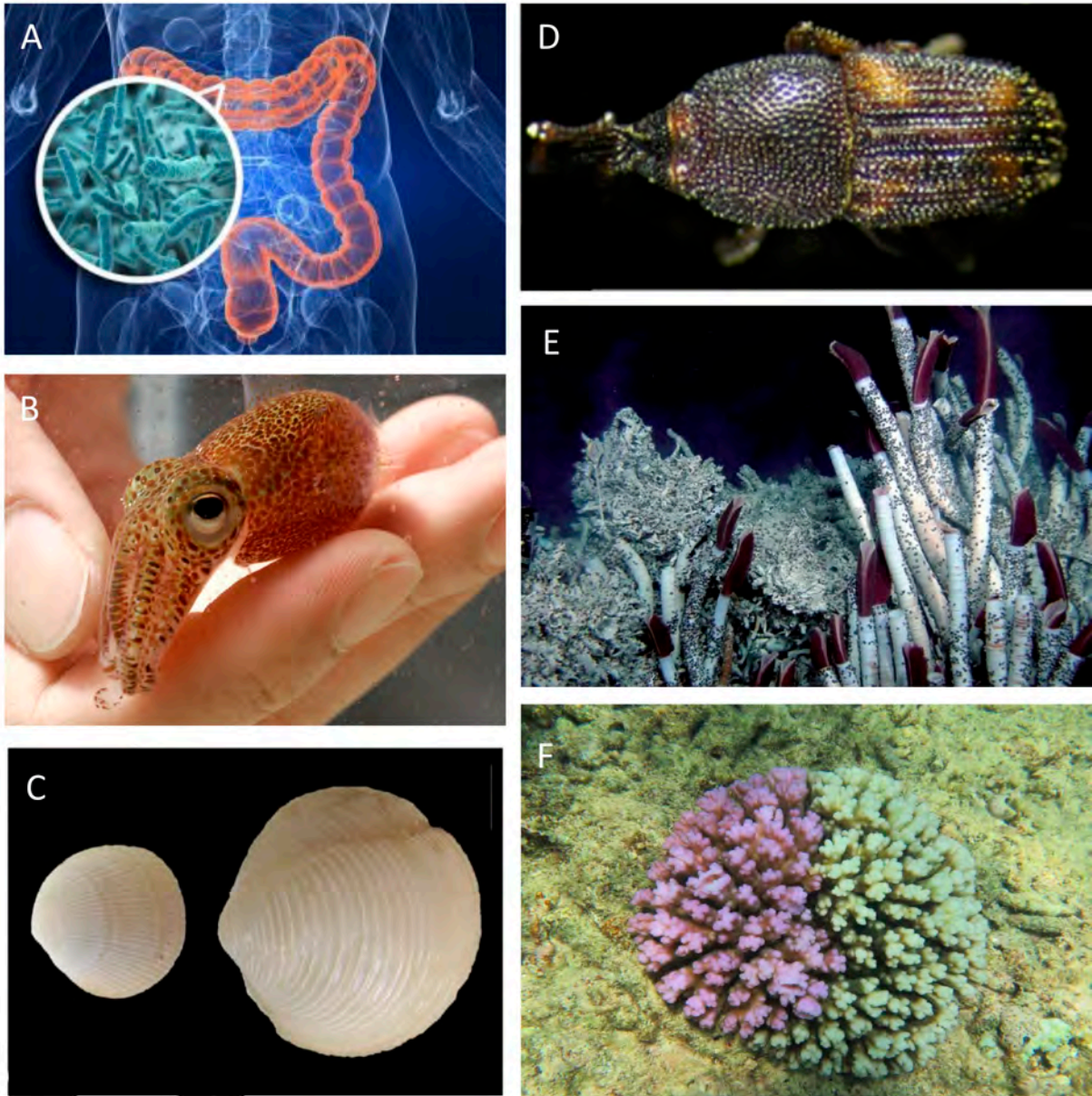
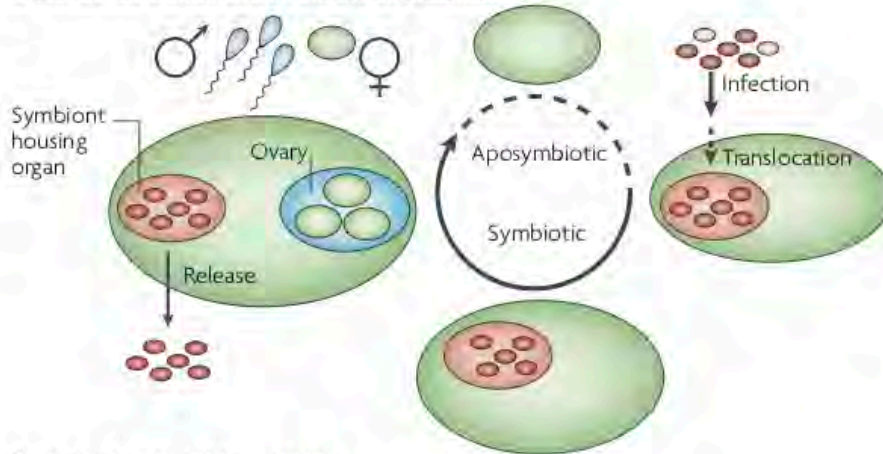


Figure 1 : Photo des 6 exemples de symbioses décrits dans l'introduction. A) Microbiote intestinal humain (© INSERM). B) La sépiole *Euprymna scolopes* (© McFall-Ngai Lab). C) Le bivalve *Codakia orbiculata* (Thèse Nathalie Elisabeth, 2011). D) Le charançon du blé (Vigneron *et al.*, 2014). E) Le vestimentifère *Riftia pachyptila* (© IFREMER). F) Corail du genre *Isopora* ayant perdu une partie de ses symbiotes, sur le côté droit de la photo (© IRD)

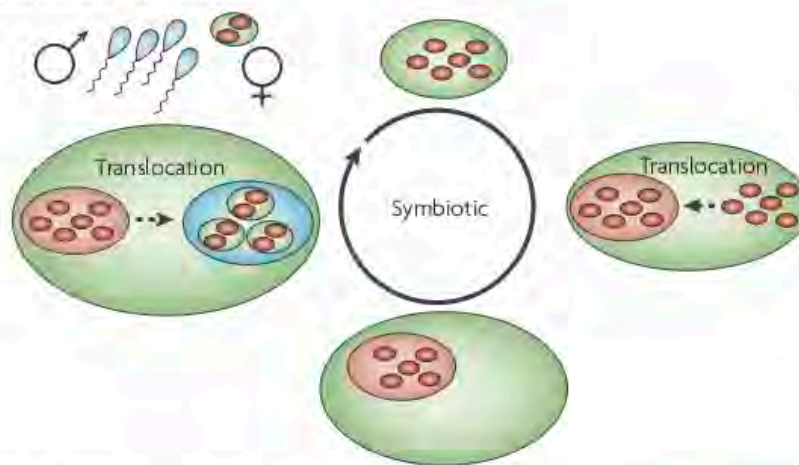
### 1.1.2 La rencontre entre les partenaires ou l'acquisition des symbiotes

L'acquisition des symbiotes se fait par deux voies : soit les symbiotes sont acquis dans l'environnement de l'hôte *i.e.* par transmission horizontale, soit ils sont transmis par les parents, par transmission dite verticale. Ces deux voies présentent des mécanismes différents pour que cette interaction soit durable à travers les générations (figure 2).

**a Horizontal transmission from the environment**



**b Vertical maternal transmission**



**c Vertical maternal transmission with occasional host switching**

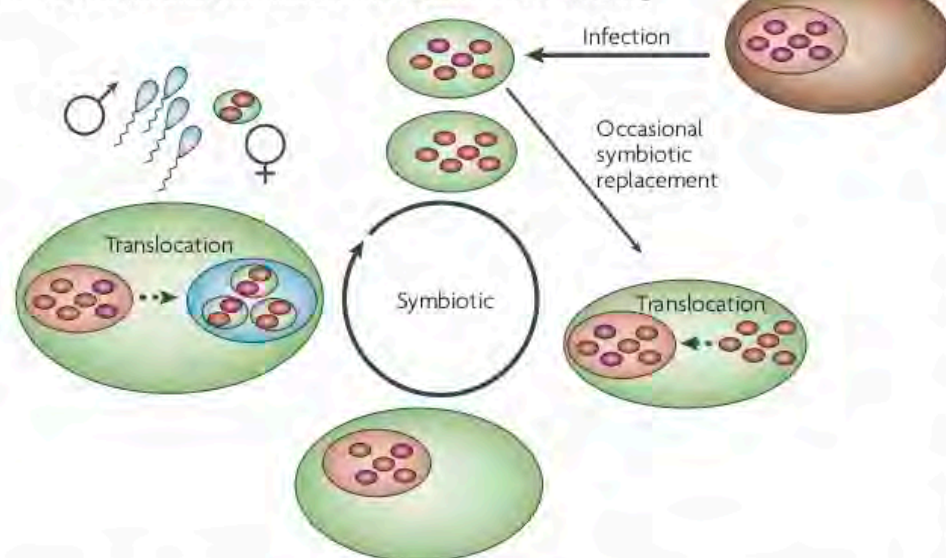


Figure 2 : les différentes voies de transmission des symbiotes: a) transmission environnementale ou horizontale. b) transmission verticale ou parentale. c) transmission verticale avec possibilité d'acquisition depuis un autre organisme (Bright and Bulgheresi, 2010).

### **1.1.2.1 La transmission horizontale**

Dans le cas de la transmission environnementale, l'hôte initialement sans symbiote (phase aposymbiotique) l'acquiert dans son environnement. Il doit donc être capable de vivre momentanément de manière autonome, dans sa phase aposymbiotique, correspondant souvent à la phase larvaire pour les espèces marines. De même, pour le symbiote, celui-ci peut avoir une forme de vie libre, voir être capable de réaliser son cycle de vie complet dans l'environnement. Si ce n'est pas le cas, on parle plutôt de transmission latérale. Le symbiote est alors transmis de proche en proche, *i.e.* d'un hôte à l'autre, sans que ceux-ci ne soient forcément parents. Le premier microbiote intestinal humain est acquis dans les 24 premières heures après notre naissance (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Notre microbiote est déjà différent selon la méthode de délivrance entre naissance par voie basse ou par césarienne (Grönlund *et al.*, 1999). Chez le jeune enfant, il va ensuite énormément varier jusqu'à se stabiliser vers l'âge de trois ans. Sa composition varie entre individus et peut changer tout au long de la vie en fonction de notre régime alimentaire, notre capital génétique et en cas de maladie (Lozupone *et al.*, 2012). L'hôte et le symbiote ont donc une phase de vie libre et une partie de leur histoire évolutive est indépendante. Les partenaires doivent donc mettre en place des mécanismes de reconnaissances moléculaires afin que la mise en place de la symbiose se renouvelle à chaque génération. Cependant, la mise en place de la symbiose est généralement assez rapide et a lieu dans les premiers stades de développement de l'hôte. La sépiole acquiert ainsi ses symbiotes juste après l'éclosion dans son environnement bien que le symbiote *Aliivibrio fischeri* représente seulement 0.1% des bactéries présentes dans le bactério-plancton (Nyholm and McFall-Ngai, 2004). La reconnaissance hôte / symbiote est une étape importante dans l'établissement de cette association hautement spécifique. Les bactéries environnementales rentrent en contact avec l'épithélium cilié du futur organe lumineux. Cela provoque la production d'un mucus qui sert de chimio-attractant, puis par la suite de substrat de croissance une fois dans l'organe lumineux. Les bactéries sont agglomérées dans le mucus et conduites *via* des pores jusqu'à l'une des deux cryptes qui constituent le futur organe lumineux (Nyholm *et al.*, 2000).

Chez le vestimentifère *Riftia*, la mise en place de la symbiose a lieu plus tard, à la fin du stade larvaire et après son installation sur le fond, par infestation de la larve à travers l'épiderme. Les bactéries sulfo-oxydantes envahissent les muscles sous-épidermiques et le mésoderme indifférencié. Dans ce dernier, les symbiotes contenus dans des vacuoles déclenchent apparemment la mise en place du trophosome. Ensuite, au stade juvénile, les bactéries sulfo-

oxydantes encore présentes dans les tissus externes sont éliminées par apoptose, de sorte que seules subsistent celles du trophosome (Nussbaumer *et al.*, 2006).

Les coraux acquièrent de manière horizontale les microalgues dans leur environnement au stade larvaire, mais aussi verticalement car certaines larves possèdent des symbiotes. Une étude sur le corail *Fungia scutaria* montre que les lectines et les glycanes à la surface des partenaires sont nécessaires à la reconnaissance hôte-symbiote (Wood-Charlson *et al.*, 2006).

Enfin, le bivalve *Codakia orbicularis* acquiert lui aussi ses symbiotes au stade juvénile dans l'environnement (Gros *et al.*, 1997), bien que le processus cellulaire de colonisation n'ait pas encore été précisément décrit.

### **1.1.2.2 La transmission verticale**

Dans le cas de la transmission verticale, les symbiotes sont transmis aux descendants *via* les gamètes de l'hôte femelle, même si, plus rarement, ils peuvent être aussi transmis par les gamètes mâles, voir par les deux parents (Bright and Bulgheresi, 2010). Ce mode de transmission fait que l'histoire évolutive de l'hôte et des symbiotes est liée. En effet, dans ce cas, il n'y a pas de renouvellement de la population symbiotique à partir de l'environnement. Par exemple chez le charançon, les symbiotes sont situés dans le caecum, ainsi que dans les ovaires et aident à la formation de la cuticule. Une fois celle-ci mise en place, les symbiotes disparaissent du caecum. Mais on les retrouve toujours dans les ovaires des femelle adultes, ce qui leur permet d'être transmis à chaque génération sans passage dans l'environnement (Vigneron *et al.*, 2014).

### **1.1.3 Diversité des structures accueillant les symbiotes et processus de la mise en place de la symbiose**

Dans le cas d'endosymbiotes intracellulaires, les symbiotes sont souvent maintenus à l'intérieur de leur hôte dans des cellules nommées bactériocytes, ces cellules étant elles-mêmes localisées dans un organe spécialisé, par exemple le bactériome chez les insectes, le trophosome chez *Riftia* ou la branchie dans le cas des lucines et des bathymodiales.

Chez la sépiole, les bactéries sont maintenues dans des cryptes. Quelques heures après le contact avec l'organe lumineux, les bactéries provoquent la morphogénèse de l'organe en induisant l'apoptose des cellules de l'épithélium superficiel, qui leur a permis de coloniser les cryptes, empêchant ainsi l'arrivée de nouvelles bactéries (Peyer *et al.*, 2018). Les hémocytes sont requis

et participent à la régression de cet épithélium qui disparaît en 96h après la colonisation par les bactéries (Koropatnick *et al.*, 2007).

Chez les *Codakia*, les symbiotes sont localisés dans des cellules épithéliales spécialisées au sein de ses branchies. À l'intérieur de ces cellules, des inclusions périplasmiques de soufre servent de réserve pour les symbiotes (Lechaire *et al.*, 2008). Ce soufre est utilisé par les symbiotes qui, *via* le cycle de Calvin-Benson, fixent le carbone dissous dans l'eau de mer et le transfèrent à leur hôte *via* la digestion de ces bactéries (Gros *et al.*, 1997).

Le charançon femelle *Sitophilus sp.* accueille dans ses cellules germinales en permanence des bactéries *Sodalis pierantonius* qui sont ensuite transmises à sa progéniture. Chez les jeunes, les endosymbiotes induisent la différenciation cellulaire des bactériocytes dans un organe spécial nommé le bactériome. Après la métamorphose, les bactéries vont se multiplier de manière intensive à l'intérieur de cet organe qui les protège du système immunitaire du charançon. Le jeune adulte dépend fortement de ses endosymbiotes pour la fabrication de sa cuticule. La dihydroxyphénylalanine (DOPA) est un composé de la cuticule dont les précurseurs sont deux acides aminés : la tyrosine (Tyr) et de la phénylalanine (Phe). Ces composants, essentiels pour la synthèse de cuticule, ne sont pas produits par l'hôte, mais par *S. pierantonius*. La symbiose lui permet d'accélérer la fabrication de son exosquelette à un moment où le jeune adulte est le plus vulnérable (Wicker and Nardon, 1982).

Le vestimentifère *Riftia pachyptila* dépend de ses symbiotes et ne possède pas de système digestif. Les bactéries sont situées dans un organe spécialisé nommé trophosome dans le tronc de l'annélide qui prend la majorité de la place de celui-ci (Nussbaumer *et al.*, 2006). Les symbiotes peuvent vivre et se développer à l'extérieur de leur hôte car ils ont aussi pu être identifiés dans l'eau environnante et dans des biofilms de multiples habitats hydrothermaux (Harmer *et al.*, 2008).

Les dinoflagellés des coraux sont hébergés dans des vacuoles intracellulaires nommés symbiosomes (Yellowlees *et al.*, 2008).

On peut donc conclure de ce rapide examen que, quel que soit l'hôte, les symbiotes ont tendance à résider dans un ou quelques organes ou structures seulement, ce qui nécessite des attractions moléculaires ciblées et/ou des processus de régulation, voir d'élimination des localisations ectopiques des symbiotes. Ces structures peuvent être uniquement dédiées à la symbiose (trophosome de *Riftia pachyptila*, bactériomes du charançon), ou correspondre à la modification d'un organe préexistant (branchie des lucines et des moules). L'étude de la structure et de la

dynamique des organes abritant les symbiotes est donc nécessaire pour comprendre les associations.

#### **1.1.4 La flexibilité de la symbiose ; un élément important de son bon fonctionnement**

Dans leur revue sur la transmission des symbiotes bactériens, Monika Bright et Silvia Bulgheresi résumant la vie des symbiotes par cette phrase : « The journey of symbionts from the initial contact to their final residence. » (Bright and Bulgheresi, 2010). Mais le tissu de l'hôte est-il vraiment la destination finale du symbiote ? Suivant l'environnement de l'hôte et/ou de ses besoins physiologiques, sa charge et sa composition symbiotique peuvent changer. Mais par quels mécanismes l'hôte ajuste-t-il son microbiote ? Ces mécanismes sont actuellement encore peu explorés, et les paragraphes suivants abordent quelques exemples connus permettant le changement de la charge d'endosymbiotes, et la variation de la composition des communautés de symbiotes.

La composition du microbiote intestinal humain est tellement différente d'un individu à l'autre que certains chercheurs la comparent à nos empreintes digitales, un code barre qui permettrait d'identifier chaque personne (Candela *et al.*, 2010). Cette composition peut changer tout au long de la vie en fonction de notre régime alimentaire, notre capital génétique ou encore en cas de maladie (Lozupone *et al.*, 2012). Par exemple, l'antibiotique ciprofloxacine, utilisé en cas d'infection, provoque un profond et rapide changement du microbiote et un changement de la composition de la communauté bactérienne pendant les 3 à 4 jours de traitement. Une semaine après le traitement, la communauté commence à retourner vers son état initial, mais le retour n'est pas toujours complet (Dethlefsen and Relman, 2011). Une étude comparative menée sur des enfants européens et des enfants du Burkina Faso montre une composition du microbiote extrêmement différente (figure 3). Les enfants des milieux ruraux d'Afrique possèdent un microbiote enrichi en *Bacteroides spp.* et faible en *Firmicutes spp.* par rapport aux enfants européens. Dans les *Bacteroides spp.* ont été trouvées des bactéries connues pour digérer la cellulose qui sont complètement absentes chez les enfants européens. Ces bactéries sont nécessaires à la digestion des fibres nombreuses dans l'alimentation des enfants du village du Burkina Faso. Clairement, leur microbiote est adapté à leur régime alimentaire (De Filippo *et al.*, 2010). Différents types de bactéries peuvent être acquis et perdus tout au long de la vie de l'Homme. La composition du microbiote humain ne dépend donc pas uniquement de l'espèce (Le « core microbiote ») mais également de son environnement. Donc un microbiote est peut



s'adapté à l'environnement et aux besoins particuliers de son hôte, sans doute à travers une régulation qui est encore mal connue.

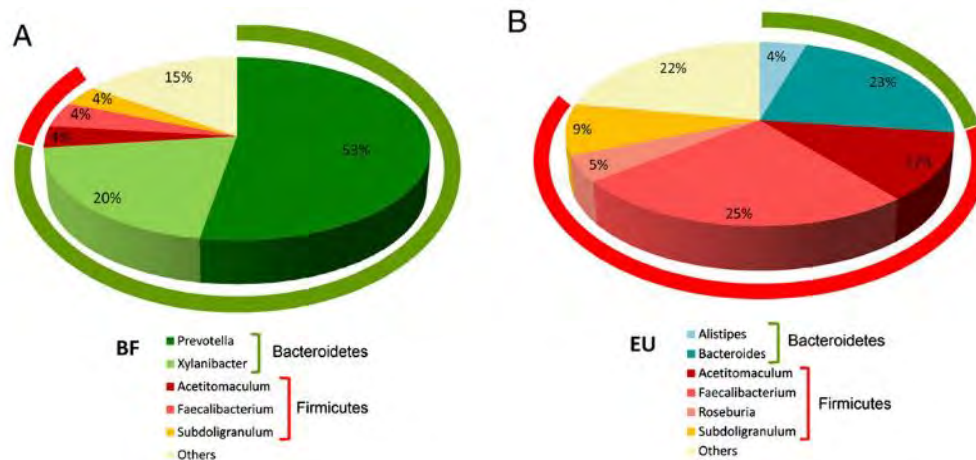


Figure 3 : Diagramme circulaire montrant les valeurs médianes des genres bactériens présent à plus de 3% dans les échantillons fécaux d'enfants du Burkina Faso (BF) et Européens (EU) (De Filippo *et al.*, 2010).

Chez la sépiole, il n'existe qu'un seul type de bactérie à l'intérieur des cryptes mais sa quantité varie tout au long de la journée. Dans l'environnement, les *Aliivibrio fischeri* ne produisent pas de lumière car elles sont présentes en faible densité. Alors qu'au sein des cryptes, elles atteignent une densité supérieure à  $10^{10}$  bactéries par ml, ce qui induit la production de lumière. L'hôte nourrit les symbiotes qui prolifèrent à l'intérieur des cryptes. *Via* un mécanisme nommé Quorum sensing, qui permet aux bactéries de percevoir leurs congénères et de synchroniser leurs expressions génétiques, les vibrios produisent de la lumière, une fois en grand nombre. Ce mécanisme stimule la transcription du gène de la luciférase qui produit l'enzyme luciférase, capable de produire de la lumière à partir d'un substrat nommé luciférine (Milton, 2006). Les bactéries vont continuer à proliférer, mais tous les matins, 95% des symbiotes vont être relargués dans l'environnement par l'hôte. Ainsi le signal s'arrête et cela provoque l'extinction de la lumière (Lee and Ruby, 1994). Dans cet exemple la régulation de la quantité de symbiotes est importante car c'est leur nombre qui permet de créer la lumière ou de l'éteindre une fois le jour venu. La régulation est ici le mécanisme qui permet le contrôle et le fonctionnement de la symbiose.

Chez les lucines, si les hôtes sont maintenus en absence de composés réduits tels que les sulfures que consomment les symbiotes, la quantité de bactéries à l'intérieur des branchies diminue rapidement. En quatre mois de jeûne, les bactériocytes ont disparu et sont remplacés par des cellules à grains. Les filaments des branchies sont réorganisés face à cette absence de symbiotes.

Les cellules à grains deviennent les cellules majoritaires de la branchie, mais leur rôle n'est pas encore connu. Les bactéries sont quant à elles digérées *via* la voie lysosomale (figure 4) (Caro *et al.*, 2009).

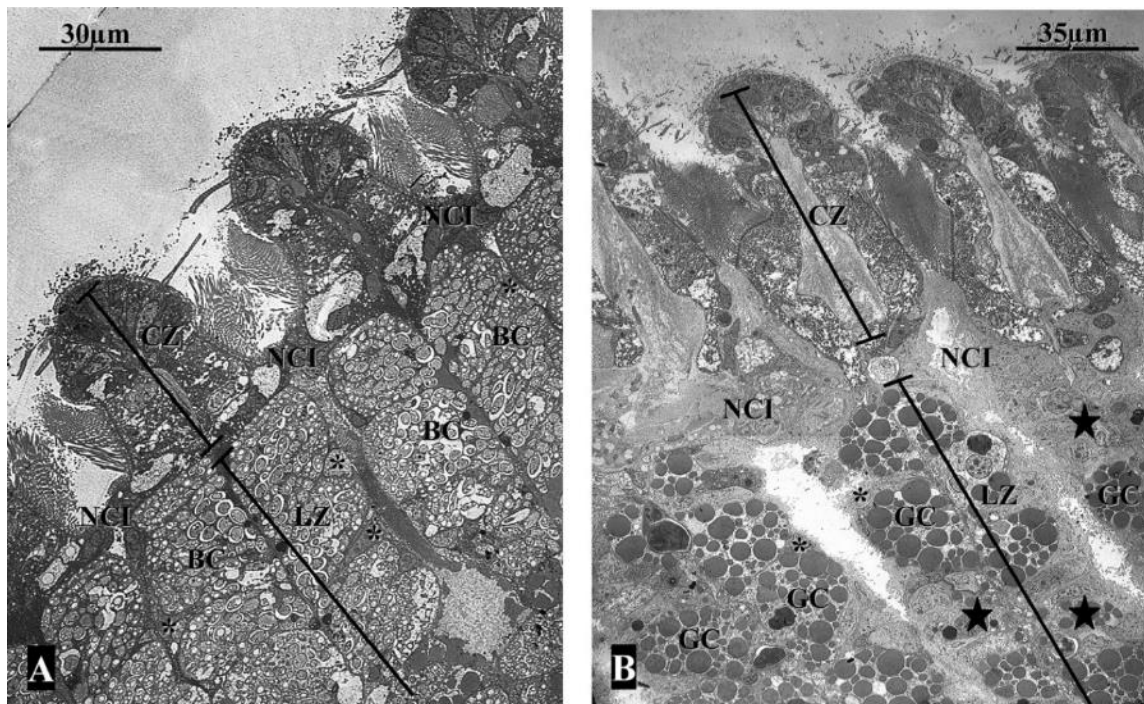


Figure 4: Ultrastructure des branchies de *Codakia orbicularis* durant un jeûne. A) Des filaments de branchies venant d'être recoltées. B) Après 4 mois de jeûne, les bactériocytes sont remplacés par des cellules à grains. (CZ) zone ciliée, (LZ) zone latérale, (NCI) cellule intercalaire non ciliée, (BC) bactériocytes, (GC) cellules à grains (Caro *et al.*, 2007).

Une fois les *Codakia orbicularis* remis dans leur milieu naturel, en présence de sulfures, les bactériocytes ré-acquièrent des symbiotes. Les bactériocytes se multiplient afin d'acquérir des symbiotes et l'excès des bactériocytes est éliminé plus tard par apoptose (Elisabeth *et al.*, 2012, 2014). Une étude sur un mois, avec l'analyse en FISH (Hybridation *in situ* en fluorescence) de l'eau de baignade des *Codakia orbicularis* n'a pas permis de mettre en évidence un relargage des symbiotes. Ce qui suggère qu'une bactérie une fois endocytée ne sera pas relarguée dans l'environnement et sera obligatoirement maintenue ou digérée par son hôte (Brissac *et al.*, 2009). L'étude en cytométrie en flux des symbiotes de la branchie a montré la présence de plusieurs copies du génome chez une seule bactérie (jusqu'à 20 copies), ce qui suggère que la réplication du matériel génétique n'est pas suivie par des divisions cellulaires. L'hôte pourrait donc inhiber la division de ses symbiotes à l'intérieur des bactériocytes afin de réguler la quantité de ses symbiotes (Caro *et al.*, 2007). Donc, les *Codakia orbicularis* acquièrent tout au long de leur vie leurs symbiotes qui ne peuvent ni repartir dans l'environnement extérieur, ni se multiplier. Ils sont condamnés à être digérés par leur hôte. Ici, la symbiose est un cul-de-sac

pour la bactérie. L'hôte contrôle entièrement sa vie en l'empêchant de fuir et même de se multiplier. L'hôte devient en quelque sorte le parasite de la bactérie. L'hôte est capable de reconfigurer sa branchie dès lors que son environnement change et qu'il ne peut plus nourrir ses symbiotes. Mais il est aussi capable de ré-acquérir cette branchie symbiotique lors de son retour dans son environnement naturel, peuplé de bactéries. La branchie chez *Codakia orbicularis* est un organe flexible qui régule ses cellules afin de les transformer en cellules pouvant abriter ou non des symbiotes selon son environnement.

Chez le charançon adulte, une fois la cuticule formée, l'hôte élimine rapidement ses symbiotes devenus inutiles. L'étude du bacteriome en microscopie électronique à transmission (MET), l'immunolocalisation de la caspase 3 active ainsi que l'utilisation du YO-PRO-1 (un marqueur de l'ADN des cellules, dont l'intégrité de la membrane plasmique est compromise) a permis de décrypter les deux mécanismes responsables de la perte des symbiotes : les symbiotes du bacteriome sont détruits par apoptose et par autophagie, deux mécanismes régulés et rapides (Vigneron *et al.*, 2014). Ces mécanismes permettent à l'hôte de recycler le matériel investi pour la multiplication des bactéries. Les bactéries détruites par autophagie vont être digérées dans la cellule par la voie lysosomale et les corps apoptotiques sont retrouvés dans la lumière de l'intestin du charançon ou dans les cellules adjacentes. Seulement chez la femelle une partie des symbiotes est maintenue en vie dans les cellules germinales, afin d'être transmis à sa descendance. Ici, la symbiose n'a un rôle que pendant une courte partie de la vie de l'hôte et va devoir être régulée en supprimant ou en limitant le nombre de symbiotes une fois leur mission accomplie.

Les symbiotes de *Riftia pachyptila* peuvent vivre et se développer à l'extérieur de leur hôte (Harmer *et al.*, 2008). Ces bactéries qui prolifèrent à l'intérieur du trophosome peuvent aussi échapper à leur hôte lors de sa mort et ainsi coloniser de nouveaux hôtes (Klose *et al.*, 2015) (figure 5). *Riftia pachyptila*, vivant en milieu hydrothermal instable, grandit très rapidement mais a une faible longévité (Pflugfelder *et al.*, 2009). Une autre espèce d'annélide Vestimentifère, *Lamellibrachia luymesii*, vit dans les zones de suintements froids et elle est caractérisée par une croissance très lente, mais une longévité importante. Une comparaison entre ces deux espèces montre, dans les deux cas, un turn-over cellulaire (quantifié par le taux de production d'ARN) très similaire (Pflugfelder *et al.*, 2009). Ceci implique que chez l'espèce à vie longue des suintements froids, le turn-over est compensé par un taux élevé d'apoptose. Chez *Riftia pachyptila*, 58.4% des cellules (figure 6) sont en multiplication dans la zone centrale (détecté par la BrdU : 5-bromo-2'-désoxyuridine) alors que 16.66% des cellules de la zone

périphérique sont en apoptose (détectée par TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling ; permet de visualiser les noyaux des cellules en apoptose), ce qui est le signe d'une croissance nette. Chez *Lamellibrachia sp.* pour les mêmes zones, 27.4% des cellules sont en multiplication et 27.93% des cellules en apoptose, signe de davantage de stabilité et d'une croissance plus faible (Pflugfelder *et al.*, 2009). Dans ce cas, la symbiose est régulée par les même processus au sein d'une même famille d'hôte, mais les rythmes sont différents en fonction du mode de vie et de la « stratégie » de l'hôte (croissance rapide dans un habitat instable, ou lente dans un habitat plus stable). La régulation elle-même peut donc évoluer et conduire à des différences importantes entre espèces pourtant proches.

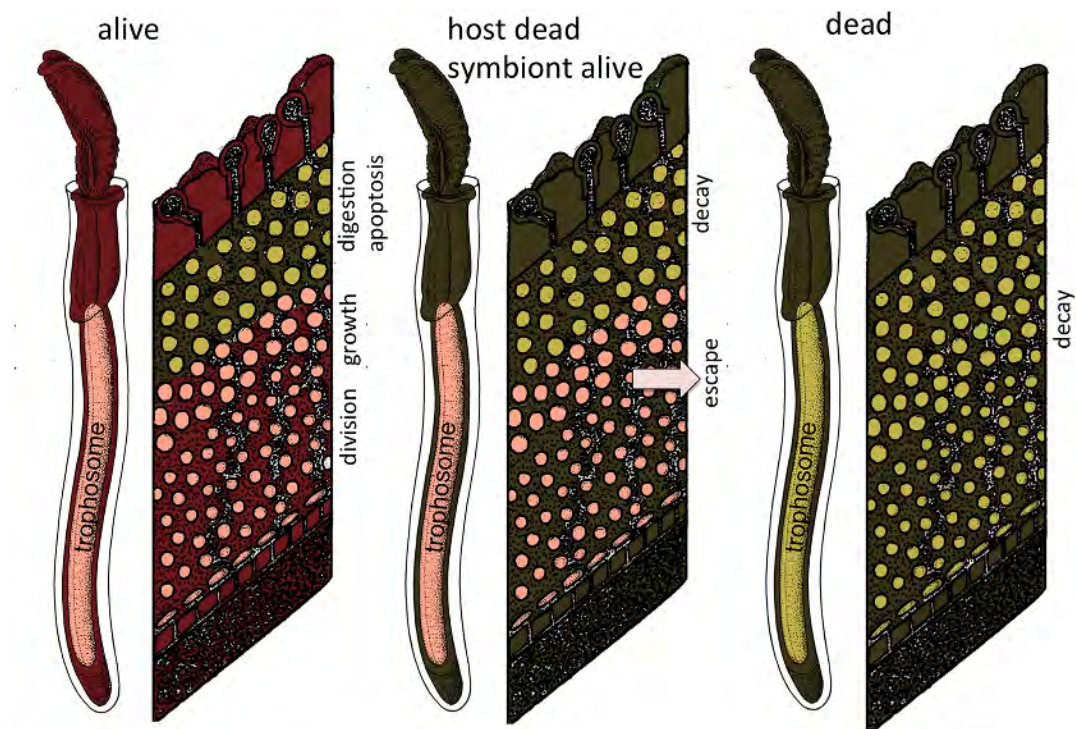


Figure 5 : Devenir des symbiotes de *Riftia pachyptila*. Chez les spécimens tout juste recoltés, l'hôte et les symbiotes sont vivants. Les cellules hôtes de la zone centrale se multiplient alors que les cellules de la zone périphérique meurent par apoptose et les symbiotes sont digérés. A la mort de l'hôte, la digestion cesse et les symbiotes peuvent être relargués (Klose *et al.*, 2016).

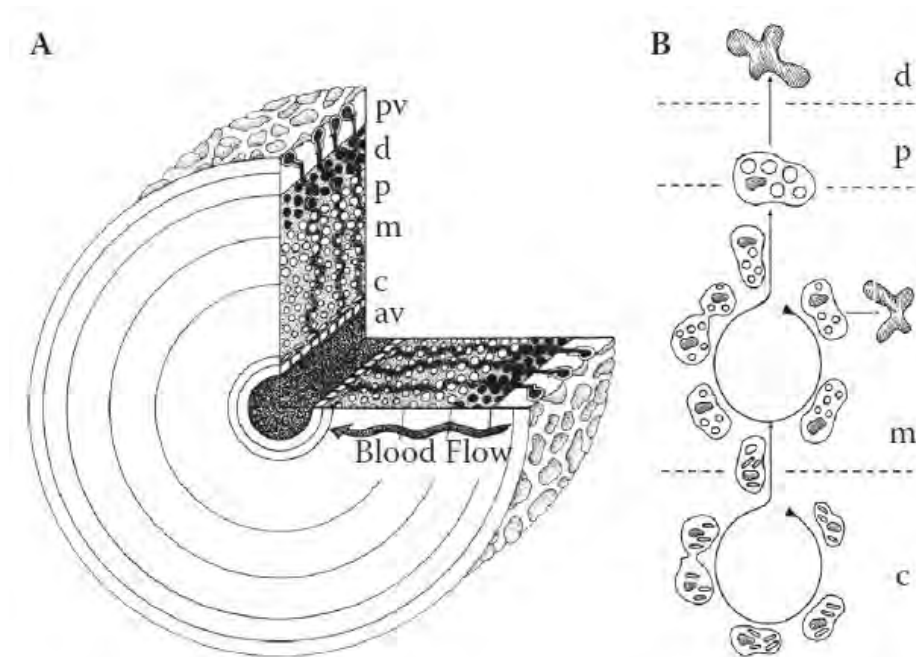


Figure 6 : A) Schéma d'un lobule de trophosome. B) Schéma du cycle des bactériocytes. Av = Vaisseau sanguin axial, zone c = centrale, m = médiane, p = périphérique, d = bactériocyte dégradé, pv= péritoine basal au vaisseau sanguin périphérique (Bright and Lallier, 2010).

Chez les coraux, la symbiose peut être périodiquement rompue. C'est ce que l'on appelle le blanchissement. Ce phénomène est dû à une réaction du système immunitaire inné de l'hôte vis-à-vis de son symbiote. Il est provoqué par un stress environnemental tel que l'élévation de la température, un changement de la salinité, des radiations ultraviolettes élevées, des polluants... (Coles and Brown, 2003). La rupture de la symbiose peut être due aux dérivés réactifs de l'oxygène (*i.e.* Reactive Oxygen Species (ROS)) toxiques pour l'hôte, mais aussi pour le symbiote. Ces ROS provoquent des dommages cellulaires tels que l'oxydation des membranes, la dénaturation des protéines et des dommages de l'ADN (Weis, 2008). Les ROS sont aussi un moyen de communication du stress entre les partenaires (Richier *et al.*, 2005; Lesser, 2006; Mone *et al.*, 2014). De nombreux mécanismes par lesquels les cnidaires pourraient perdre leurs symbiotes ont été décrits, comme la mort cellulaire et le relargage. Tous n'ont pas été mis en évidence chez les cnidaires symbiotiques (Weis, 2008). Dans cet exemple, les symbiotes peuvent devenir toxiques et sont éliminés rapidement, mais l'hôte doit vite pouvoir les réacquérir pour survivre.

Il apparaît donc que, tout au long de la vie de l'holobionte, la qualité et la quantité de symbiotes doivent être régulées. Cette régulation est importante pour différentes raisons : le symbiote peut devenir toxique pour l'hôte, ou alors inutile, ou encore la population symbiotique doit être adaptée à l'environnement de l'holobionte. Cette régulation est un élément très important du

dialogue hôte/symbiote. Les mécanismes cellulaires impliqués dans cette régulation sont retrouvés dans les différents exemples développés dans la partie suivante.

### 1.1.5 Les mécanismes impliqués dans la régulation de la symbiose et leur mise en évidence

#### 1.1.5.1 Augmentation du nombre de symbiotes

Comme vu dans la partie précédente, les symbiotes peuvent être acquis par endocytose mais aussi se multiplier à l'intérieur de leur hôte. Leur abondance peut aussi augmenter en multipliant les cellules qui les accueillent. Dans la partie suivante seront présentés les mécanismes de multiplication cellulaire chez l'hôte et les symbiotes permettant d'augmenter le nombre de symbiotes.

##### 1.1.5.1.1 La multiplication cellulaire chez l'hôte ou le symbiote eucaryote

Chez *Codakia orbicularis* et *Riftia pachyptila*, l'augmentation du nombre de cellules pouvant accueillir leurs symbiotes permet d'augmenter la quantité de bactéries (figure 7 et 8).

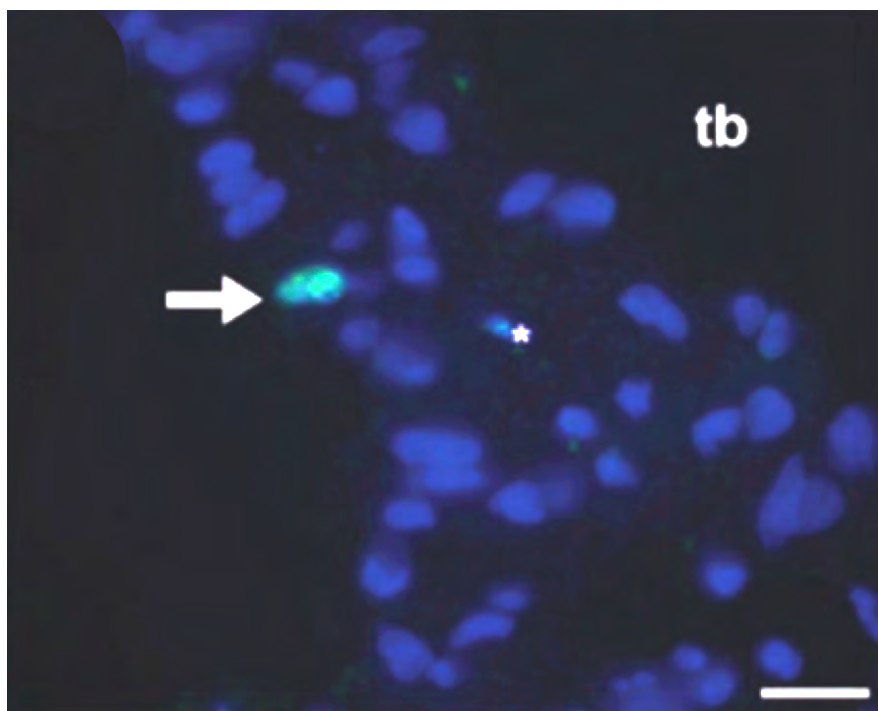


Figure 7 : Photo d'une zone ciliée d'une branchie de *Codakia orbicularis* montrant en vert un marquage de la phospho-histone H3. En bleu, le signal DAPI. La flèche montre le marquage d'un noyau d'une cellule ciliée en cours de mitose, et l'étoile, un hémocyte marqué. tb (tissu bride) = pont tissulaire. Barre d'échelle : 20 $\mu$ m (Caro *et al.*, 2009)

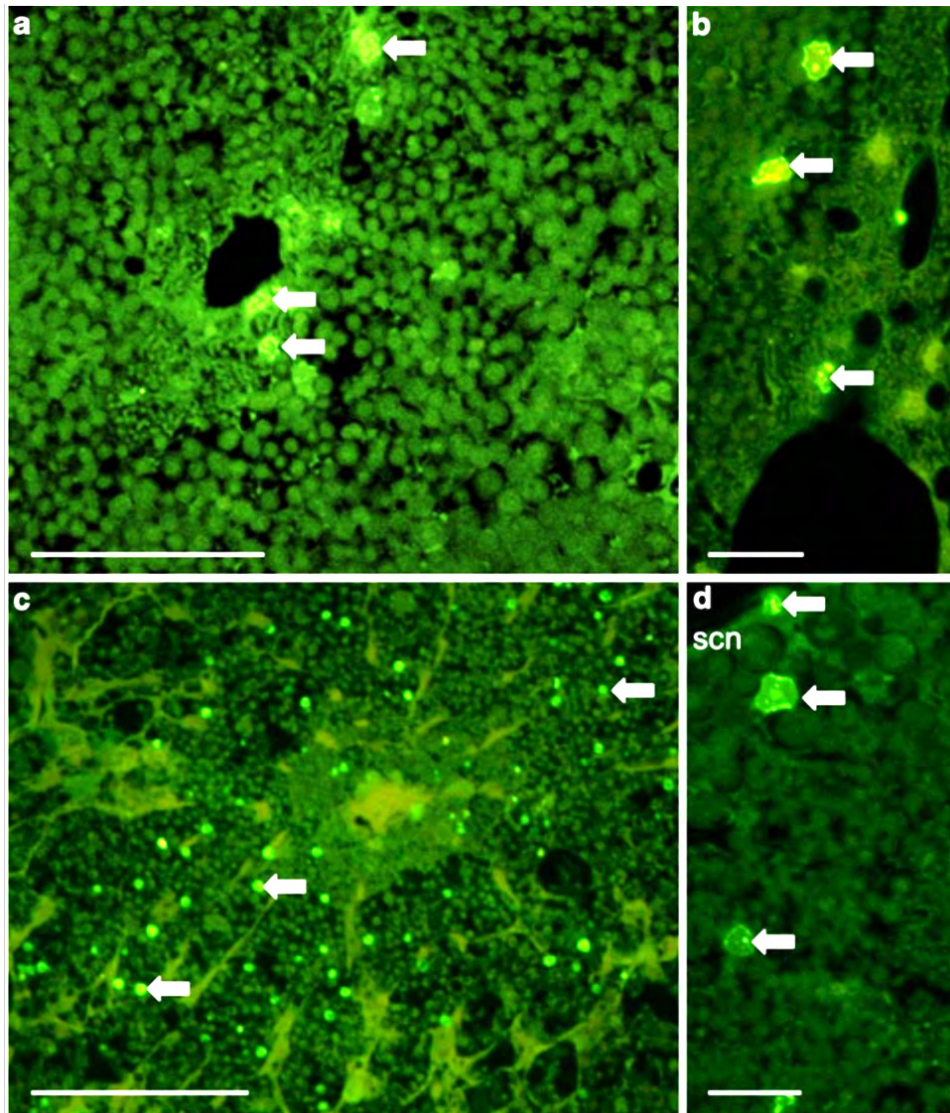


Figure 8 : Photo au microscope à épifluorescence de coupe du ver *Riftia pachyptila* qui a incorporé du BrdU. A et B) Noyaux marqués au BrdU dans la région des bactériocytes après une incubation au BrdU de 30min (flèches). C) Noyaux marqués au BrdU dans la région des bactériocytes après une incubation de 3h. D) Noyaux marqués au BrdU dans le trophosome dans la région médiane et périphérique. Barre d'échelle : A) 50 $\mu$ m B) 10 $\mu$ m C) 100 $\mu$ m et D) 10 $\mu$ m (Pflugfelder *et al.*, 2009).

Le cycle cellulaire est composé de plusieurs étapes : des phases de croissance où la cellule croît et duplique son matériel génétique (interphase) et d'une phase de mitose (Schafer, 1998).

L'interphase se divise en trois étapes : G1, S et G2 (figure 9). L'étape G1 est la plus longue car c'est la phase où la cellule effectue son métabolisme habituel. Pendant cette étape, la cellule croît jusqu'à atteindre une taille nécessaire pour sa division. Puis vient la phase S où l'ADN de la cellule va être répliqué grâce à l'ADN-polymérase. Au début de la phase S, l'ADN est sous forme de chromatide simple. A la fin de la phase S, l'ADN est compacté et les chromatides sont

reliées deux par deux au niveau d'un centromère pour former les chromosomes. Ensuite, pendant l'étape G2, les centrosomes se répliquent et à la fin de cette étape commence la mitose. La mitose est la division cellulaire de la cellule initiale en deux cellules-filles génétiquement identiques.

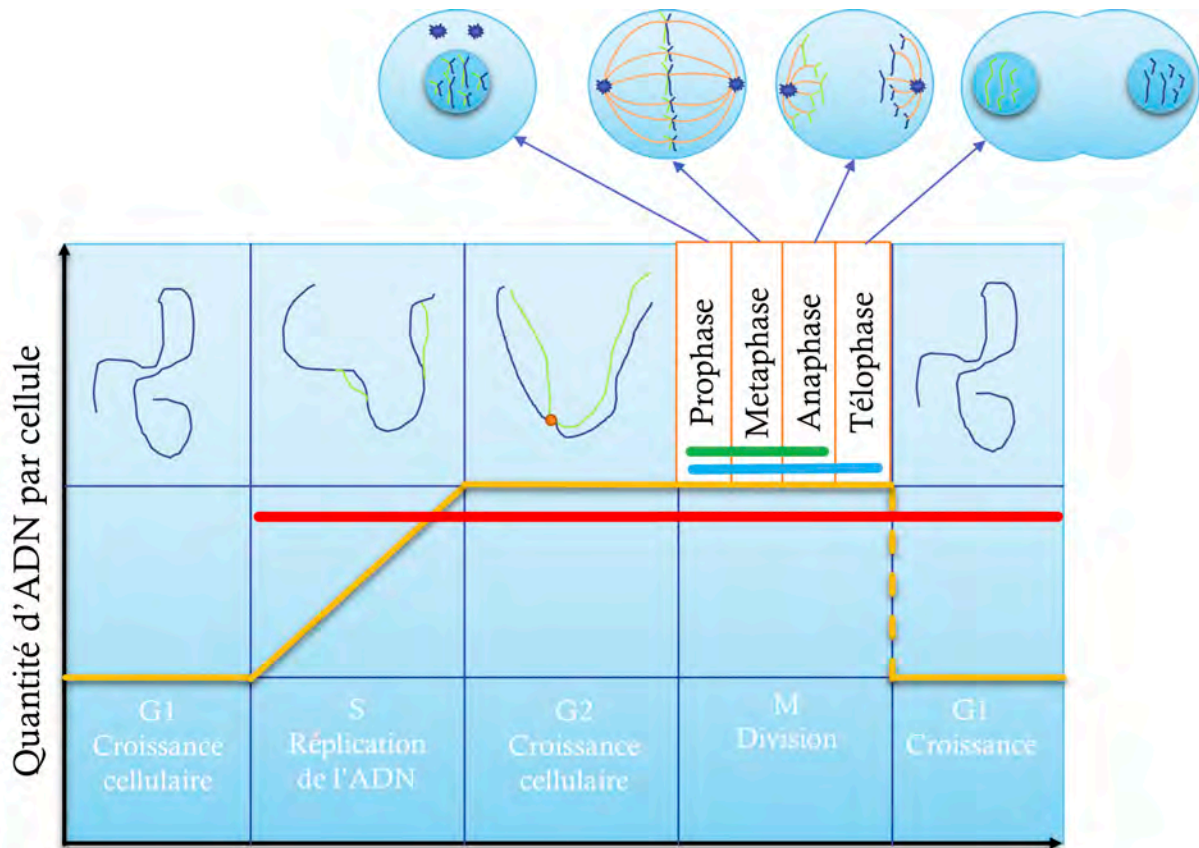


Figure 9 : Schéma représentant le cycle cellulaire (dessin B. Piquet). Les lignes indiquent les moments où le processus de multiplication cellulaire est détectable. La ligne verte : La phospho-Histone H3, La ligne bleue : la microscopie électronique à transmission et la ligne rouge : le BrdU et l'EdU.

Des marqueurs cellulaires fluorescents permettent de repérer les différentes étapes du cycle cellulaire dans les tissus en microscopie optique à fluorescence (épifluorescence ou confocale). L'immunomarquage de la phosphorylation de l'histone H3, qui est un mécanisme très conservé, est un moyen de visualiser les cellules en prolifération. Cette phosphorylation a lieu durant la prophase tandis que sa déphosphorylation a lieu durant l'anaphase (Li *et al.*, 2005). La phosphorylation de l'histone H3 permet la condensation des chromosomes (Henzel *et al.*, 1997). Ce mécanisme est requis pour l'alignement des chromosomes lors de la métaphase (Dai, 2005). Le marquage de l'histone H3 permet de détecter de très courtes périodes du cycle cellulaire (figure 10), comme cela a été fait par exemple chez *Codakia orbicularis* (Elisabeth *et al.*, 2012).



Le BrdU ou Bromure d'Uracyle, est un nucléotide synthétique analogue de la thymidine qui peut être intégré à l'ADN en phase S si on incube les cellules en sa présence. Il restera détectable pendant plusieurs cycles de divisions cellulaires (Gratzner, 1982). L'EdU ou 5'-ethynyl-2'-déoxyuridine est une méthode plus récente que le BrdU. C'est également un nucléotide synthétique qui s'intègre à l'ADN lors de sa réplication en phase S et restera dans l'ADN pendant le reste du cycle cellulaire. La révélation de l'EdU est plus simple et plus rapide que le BrdU, mais encore peu utilisée sur des invertébrés et chez aucun bivalve à notre connaissance. Ces deux méthodes permettent néanmoins de détecter les cellules ayant récemment répliqué leur ADN.

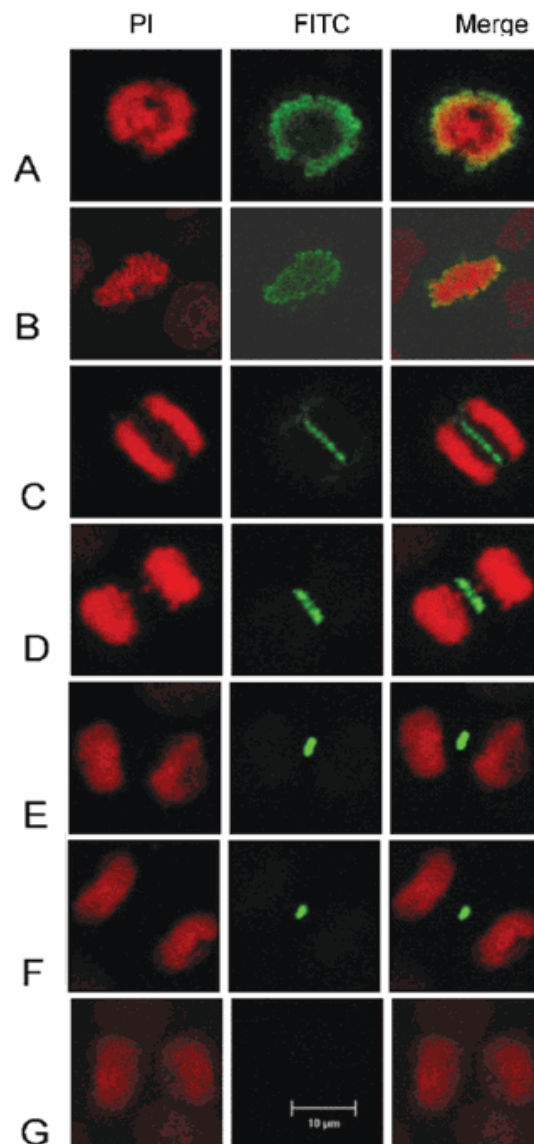


Figure 10 : Distribution de la phospho-histone H3 à différentes étapes de la mitose cellule MCF-7 (lignée de cellule tumorale). A) : fin de prophase. B) : métaphase. C) : anaphase. D) et E) : télophase. F) et G) fin de mitose. PI : ADN marqué avec du PI (rouge), FITC : anticorps anti-phospho-histone H3 couplé au fluorochrome FITC (vert) et Merge : superposition des signaux PI et FITC (Li *et al.*, 2005).

#### 1.1.5.1.2 La division bactérienne

Pour augmenter la quantité de symbiotes, ceux-ci peuvent se multiplier à l'intérieur de leur hôte. Dans le cas de la sépiole, l'hôte apporte des nutriments à ses symbiotes afin de leur permettre de se multiplier et d'atteindre une densité suffisante pour activer la luciférase qui produira la lumière (Nyholm and McFall-Ngai, 2004). Inversement, dans le cas des lucines, l'hôte empêche justement la multiplication de ses symbiotes (Caro *et al.*, 2007)

Les symbiotes des lucines, de *Riftia pachyptila* et des bathymodioles sont des *Gammaproteobacteria*. Il est possible de suivre leur division grâce à un marqueur nommé FtsZ, pour Filamentous Temperature Sensitive, et qui est la protéine-clé de la division bactérienne.

Cette protéine forme un anneau dans le plan de division pour débiter l'élongation du procaryote (Bi and Lutkenhaus, 1991). FtsZ est une protéine très conservée et présente chez la majorité des bactéries et des archées. La FtsZ est similaire aux tubulines qui interviennent lors de division des cellules eucaryotes (Vaughan *et al.*, 2004). Cet anneau permet la cytodièrese et la ségrégation des chromosomes entre les cellules-filles bactériennes. Il attire d'autres protéines, telles que la FtsA (ATP-hydroxylase) qui fournit l'énergie sous forme d'ATP pour assembler les protéines dans le divisome. ZipA permet l'ancrage de l'anneau FtsZ à la membrane plasmique, la FtsI (ou PBP3) transpeptidase est requise pour la synthèse du peptidoglycane FtsK, qui intervient dans la séparation de l'ADN et leur ségrégation dans les cellules-filles (Vinella and D'Ari, 1995; Adams and Errington, 2009). Un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine FtsZ a été développé chez la *Gammaproteobacteria Escherichia coli* afin de suivre la multiplication des bactéries et a par exemple été utilisé avec succès sur les symbiotes d'un nématode marin (figure 11) (Pende *et al.*, 2014).

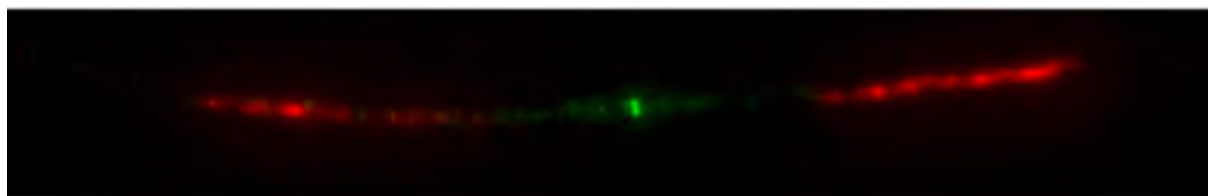


Figure 11 : Division d'un symbiote *Gammaproteobacteria* du nématode marin *Eubostrichus dianeae*. En rouge l'ADN et en vert l'anneau FtsZ qui sépare les deux bactéries (Pende *et al.*, 2014).

### **1.1.5.2 Diminution du nombre de symbiotes**

Le blanchissement du corail dû à la perte des symbiotes est étudié depuis des décennies et ses mécanismes sont connus : l'exocytose, la dégradation *in situ* et la mort cellulaire programmée ou non (figure 12). Chez les coraux *Acropora grandis* et *A. pulchella*, lors du blanchissement, les symbiotes peuvent être exocytés de manière active. En effet, des symbiotes ont été trouvés dans la cavité gastrique, ainsi qu'une forte concentration de  $Ca^{2+}$  dans le milieu extracellulaire, un ion qui déclenche l'exocytose régulée (Steen and Muscatine, 1987; Fang *et al.*, 1997). Les symbiotes peuvent aussi être dégradés. Il existe deux mécanismes possibles : soit le symbiote meurt à cause d'une trop grande concentration en ROS et il est alors digéré par la cellule hôte, c'est l'autophagie. Soit l'hôte détruit le symbiote suite à un stress, ce qui suggère une réponse du système immunitaire inné du cnidaire et c'est l'apoptose (Dunn *et al.*, 2007; Weis, 2008). Downs propose que cette digestion intracellulaire du symbiote par l'hôte soit nommée 'symbiophagie' (Downs *et al.*, 2009).

En cas de stress thermique, l'anémone *Anemonia viridis* perd ses symbiotes par l'apoptose des cellules les abritant. Ce stress provoque la libération de ROS, qui vont activer les caspases, dont un équivalent de la caspase 3. Cette enzyme activée va provoquer la mort de la cellule (Richier *et al.*, 2006). D'autres études démontrent la libération de cellules entières vivantes, contenant encore les symbiotes. Ces phénomènes sont liés à un effondrement du cytosquelette *via* des flux intracellulaires de  $Ca^{2+}$  (Gates *et al.*, 1992; Sawyer and Muscatine, 2001). Mais le mécanisme décrit ici correspond à la première étape de l'apoptose (Häcker, 2000; Weis, 2008). Si le blanchissement, et donc la rupture de la symbiose, dure trop longtemps, cela peut provoquer la mort de l'hôte par privation de nourriture et donc sa nécrose.

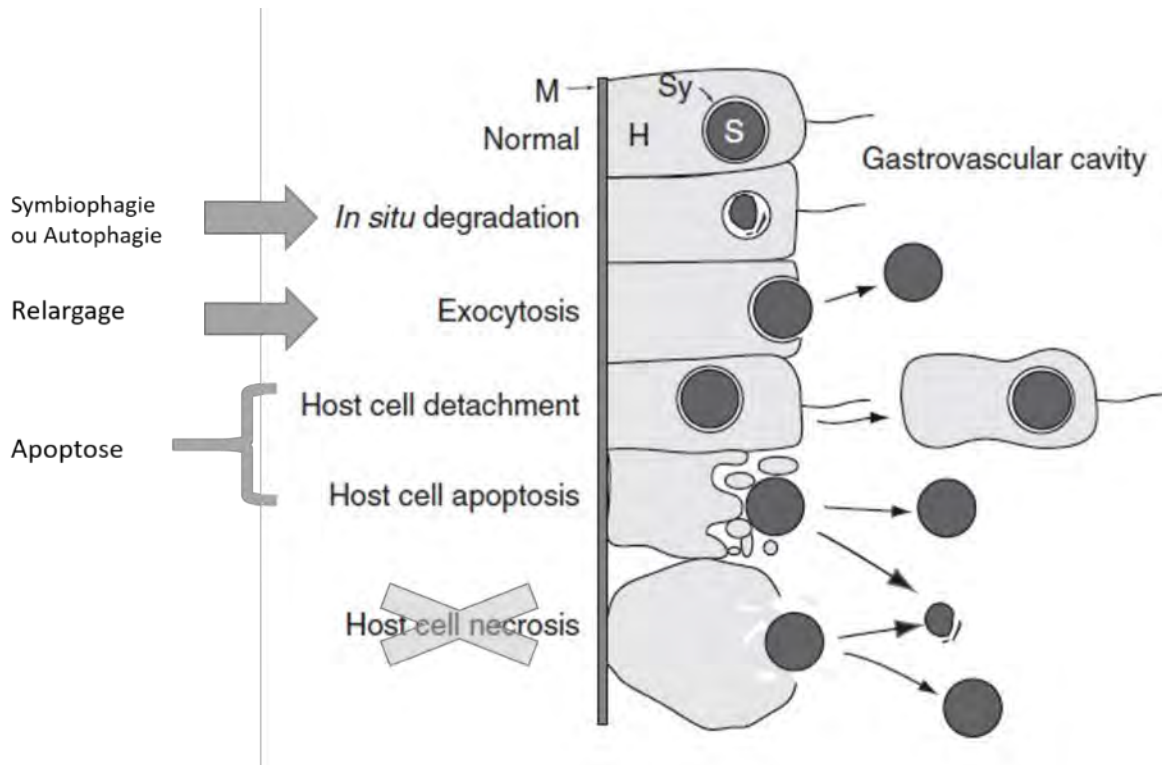


Figure 12 : Cinq types différents de mécanismes cellulaires de la perte de symbiote dans le tissu des Coraux. De haut en bas : cellule normale, digestion du symbiote *in situ*, expulsion du symbiote par exocytose, détachement de la cellule accueillant les symbiotes, apoptose de la cellule et en dernier nécrose de la cellule. H : cellule de l'Hôte, Sy : Symbiote, M : Mésogée (Weiss, 2008).

Chez le charançon du blé, après la formation de la cuticule, l'hôte n'ayant plus besoin des symbiotes qui l'ont aidé à synthétiser sa cuticule, il se débarrasse de ses symbiotes. Il digère ses symbiotes et les cellules qui les accueillait rentrent en apoptose (figure 13). Grâce à ce mécanisme, il récupère une partie de l'énergie fournie pour la maintenance de ses symbiotes (Vigneron *et al.*, 2014).

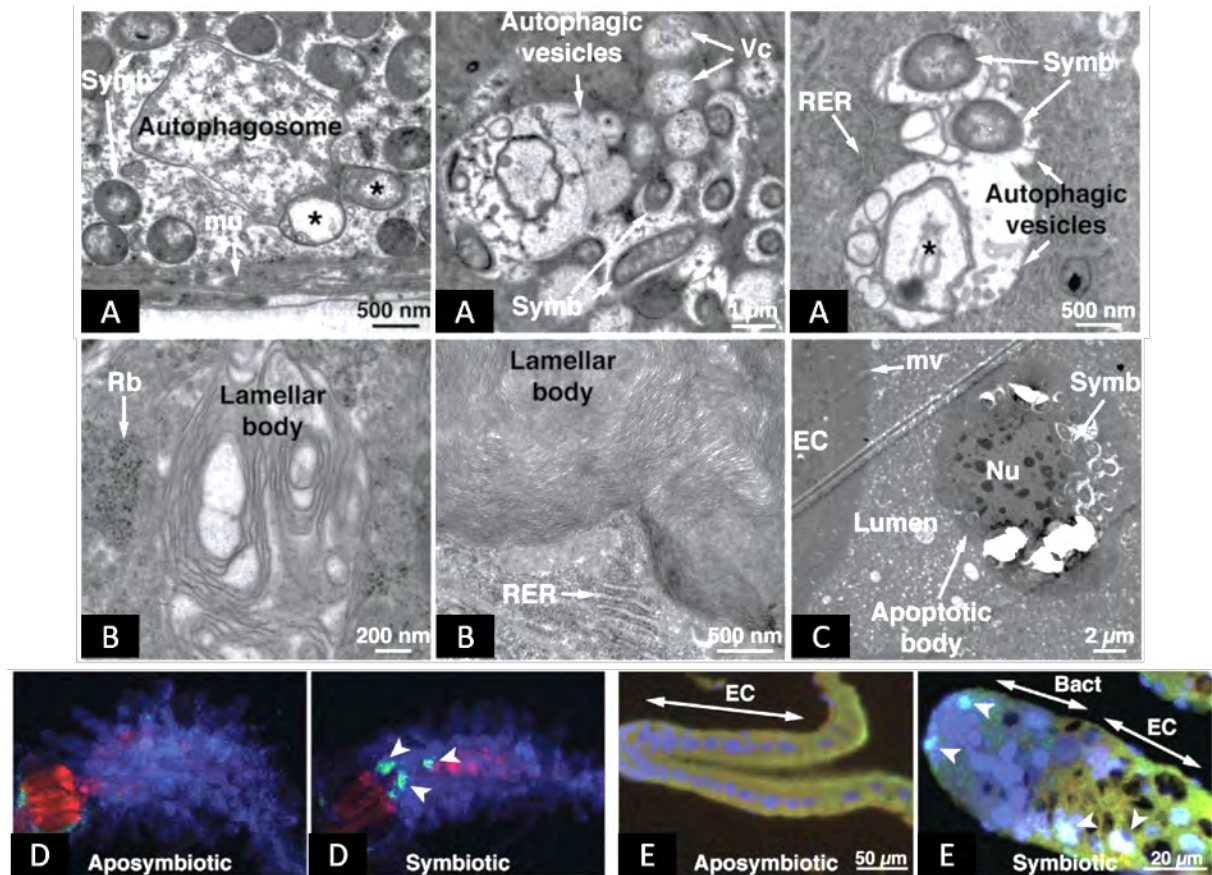


Figure 13 : Autophagie et apoptose des cellules lors de l'élimination des symbiotes dans le bacteriome du charançon. A) Autophagosome digérant *S. pierantonius* \*. B) Corps multilamellaire, résultat de l'autophagie. C) Digestion d'un corps apoptotique. D) Marquage YO-PRO en vert révélant la cellule en apoptose et en Bleu l'ADN des noyaux marqués au DAPI chez des charançons symbiotiques et aposymbiotiques. E) Immunolocalisation de la caspase 3 active en vert et Hoechst marquant en bleu l'ADN des noyaux chez des charançons (Vigneron et al., 2014).

D'après les exemples développés dans l'introduction, on peut clairement identifier 3 principaux mécanismes cellulaires impliqués dans la perte de symbiotes : l'exocytose des symbiotes, leur digestion et la mort programmée des cellules qui les accueillent. Ces processus visent directement le symbiote et sa cellule d'accueil. Dans le cas de la sépiole cependant, l'apoptose ne vise pas les cellules accueillant les symbiotes (localisées dans des cryptes). En effet, l'apoptose y est induite par les bactéries symbiotiques elles-mêmes et provoque la mort des cellules ciliées ayant initialement permis aux symbiotes de coloniser les cryptes. Donc l'apoptose ici empêche l'entrée de nouvelles bactéries en provoquant un changement morphologique (figure 14).



Figure 14 : Image en microscopie à fluorescence montrant l'organe lumineux d'*Euprymna scolopes*. En bleu les noyaux des cellules, en vert le marquage TUNEL marquant les noyaux des cellules en apoptose et en rose la rhodamine phalloïdine permettant de localiser les filaments d'actine (d'après (Peyer *et al.*, 2018)).

La quantité de symbiotes peut diminuer par la mort de la cellule qui les accueille ou par la digestion ou le relargage des bactéries. Dans la partie suivante, les mécanismes de mort cellulaire vont être décrits, en particulier l'apoptose que nous avons étudié lors de cette thèse.

#### 1.1.5.2.1 Les morts cellulaires et l'apoptose

Le terme apoptose vient du grec Apoptosis (ἀπόπτωση) qui désigne la chute naturelle des pétales d'une fleur ou des feuilles d'un arbre, en fin de saison. Décrit pour la première fois chez l'Homme en 1972, ce phénomène sert à contrôler les populations de cellules, mais a aussi un rôle immunitaire en provoquant la mort des cellules infectées par des pathogènes (Kerr *et al.*, 1972). L'apoptose a un rôle fondamental lors du développement des embryons en participant à la formation des organes. Par exemple, chez le fœtus humain, la mort programmée des cellules entre les doigts permet de les individualiser (Glücksman, 1951). Ce processus est extrêmement conservé au niveau des changements morphologiques de la cellule.

##### 1.1.5.2.1.1 Cytologie de l'apoptose

Nous allons ici décrire les étapes de l'apoptose. Tout d'abord, nous avons la pycnose : la condensation irréversible de la chromatine le long de la membrane du noyau avec la fragmentation de l'ADN, appelée aussi caryorrhexie (figure 15, étape 1). La cellule devient plus

petite et le cytoplasme se densifie. Dans une deuxième étape, des bourgeonnements de la membrane plasmique apparaissent (figure 15, étape 2) et la cellule se sépare du tissu et des autres cellules voisines. Les organites sont intacts alors que le réticulum endoplasmique est dilaté ; il relâche les ribosomes qui s'agrègent. La cellule perd ses microvillosités, elle se désintègre en plusieurs corps apoptotiques (figure 15, étape 3) qui contiennent chacun une partie du matériel cellulaire. Ils peuvent être de tailles et de compositions variées. Enfin, la dernière étape est la phagocytose (figure 15, étape 4) des corps apoptotiques par les cellules voisines *via* la voie lysosomale, permettant ainsi le recyclage des composés de la cellule apoptotique. Ces dernières étapes sont rapides, environ 1 à 3h chez les mammifères et donc difficiles à observer en microscopie électronique (Kerr *et al.*, 1972; Häcker, 2000).



Figure 15 : Schéma représentant les différentes étapes des changements morphologiques de la cellule lors de l'apoptose

#### 1.1.5.2.1.2 La voie de l'apoptose chez le nématode *Caenorhabditis elegans*

La cascade moléculaire de l'apoptose a été très étudiée chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ces études ont permis de révéler les gènes régulant et aboutissant à la mort de 131 cellules somatiques sur 1090 lors du développement de ce ver. L'apoptose est un programme qui peut être initié ou inhibé. Les protéines CED-3 et CED-4 (cysteine-dependent aspartate-directed protease) sont responsables du déclenchement de l'apoptose (Yuan and Horvitz, 1990). Ces protéines sont inhibées par la CED-9 (Hengartner and Horvitz, 1994). CED-9 peut être elle-même inhibé par Egl-1 (Egg-laying defective) (figure 16). Une douzaine de gènes ont été découverts mais les gènes codant pour les protéines décrites ci-dessus sont les plus importants pour le déclenchement de l'apoptose chez *C. elegans* (Abraham and Shaham, 2004).

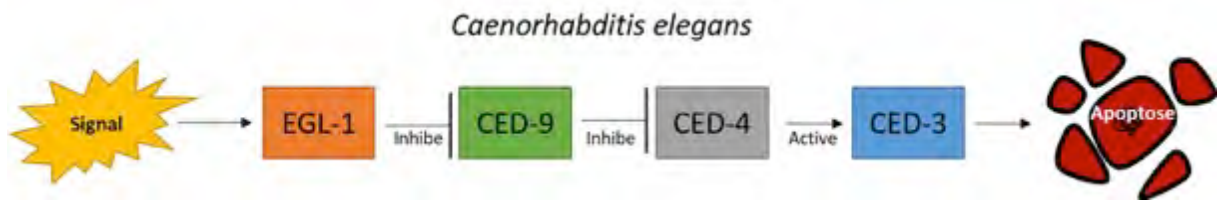


Figure 16 : Schéma représentant la voie de l'apoptose chez le nématode *Caenorhabditis elegans*

#### 1.1.5.2.1.3 Les caspases ou les exécuteurs de la mort

Chez les mammifères, des protéines de type CED 3 et 4 ont été identifiées. Ce sont des enzymes nommées caspases (Cysteine-ASPpartic-proteASES). Il existe une douzaine de caspases réparties en 3 catégories : initiatrices, exécutrices de l'apoptose et inflammatoires (dans le cas de la nécrose, car l'apoptose ne s'accompagne en principe pas d'inflammation). Les caspases initiatrices et exécutrices sont impliquées dans la traduction du signal de mort cellulaire et sont responsables de nombreux changements biochimiques et morphologiques associés à l'apoptose. Les caspases initiatrices conduisent le signal de traduction. Elles sont présentes sous forme de monomère inactif ou zymogène dans le cytoplasme. La dimérisation des pro-caspases initiatrices va permettre de déplacer une boucle d'activation (en orange sur la figure 17) permettant ainsi de démasquer le site actif (en jaune). Contrairement aux caspases initiatrices, les caspases exécutrices existent sous la forme inactive de dimères dans le cytoplasme. Les caspases initiatrices vont être clivées dans la région de la liaison inter-domaine (en vert sur la figure 17). Ces caspases exécutrices agissent sur les protéines du cytosquelette, sur la mitochondrie, la membrane nucléaire et sur la chromatine.

La caspase 3, exécutrice, active un hétérodimère, le DNA-Fragmentation Factor (DFF) qui est responsable de la fragmentation de l'ADN, l'une des premières étapes de l'apoptose (Boatright and Salvesen, 2003). La dimérisation et le clivage des caspases nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP. C'est pour cette raison que l'apoptose est considérée comme un phénomène actif, contrairement à la nécrose. L'activation de la caspase 3 a longtemps été considérée comme marquant le point de non-retour au-delà duquel l'apoptose devient irréversible, mais cette interprétation est désormais questionnée (Kroemer *et al.*, 2005).



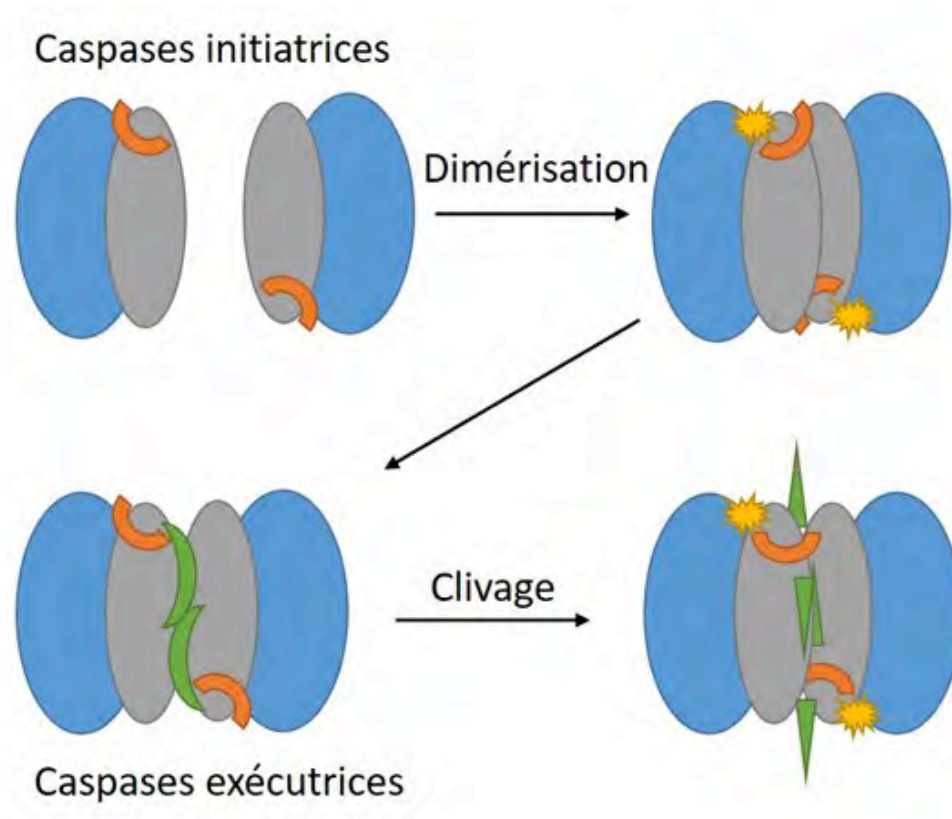


Figure 17 : Activation des caspases lors de l'apoptose. En gris et bleu sont représentés les 2 sous-unités des caspases. En jaune le site actif, permettant de cliver les cibles de la caspase. En orange les boucles protégeant le site actif et le rendant inaccessible. Chez les caspases exécutrices, la région inter-domaine empêchant le déplacement de la boucle du site actif apparaît en vert. Lors de la dimérisation de la pro-caspase, la boucle orange est transloquée libérant ainsi le site actif en jaune. Chez les caspases exécutrices, le clivage de la région inter-domaine (en vert) permet le déplacement de la boucle orange et donc de la libération du site actif (d'après (Boatright and Salvesen, 2003))

De manière peut être surprenante, des analyses génétiques récentes ont démontré que le réseau apoptotique est plus étendu et plus complexe chez les mollusques que chez les mammifères (Romero *et al.*, 2015), mais cela tient peut-être au contact direct de l'épiderme branchial des bivalves avec l'eau environnementale, souvent chargée de xénobiotiques.

L'apoptose chez les mammifères, ainsi que chez les mollusques, peut être activée par 2 voies : La voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Autrement dit, le signal de mort cellulaire peut donc venir soit du milieu intracellulaire, soit du milieu extracellulaire par des voies distinctes.

La voie extrinsèque fait intervenir un récepteur membranaire à la surface de la cellule, tandis que la voie intrinsèque se produit entièrement au sein du cytoplasme. Cependant, dans les deux cas, les causes qui activent ces voies peuvent provenir du milieu extérieur.

#### 1.1.5.2.1.4 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque est induite par une diversité de stimuli intracellulaires sans l'intervention des récepteurs membranaires à la surface de la cellule. Les stimuli sont par exemple les ROS (Reactive Oxygen Species) qui causent des dommages irréversibles de l'ADN, suite à des radiations UV ou à des polluants environnementaux.

L'activation de cette voie se fait par des protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), l'équivalent de CED-9. Les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-XL interagissent avec les pro-apoptotiques tel que Bax (Bcl-2-associated X) pour empêcher la libération du facteur apoptogène (Etape 1 de la figure 18). Cependant, l'activation des protéines cytosoliques BH3 (Bcl-2 homology domain 3) favorise la protéine Bax qui induit une importante formation de pores dans la membrane mitochondriale externe (Etape 2 figure 18) (Hengartner, 2000; Levine *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2015). La perméabilisation de la membrane mitochondriale provoque le relargage dans le cytoplasme de protéines pro-apoptiques comme le cytochrome C, AIF (Apoptosis Inducing Factor) et SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct Inhibitor of Apoptosis Protein Binding proteins with low pI *i.e.* potentiel ionique) (Adrain *et al.*, 2001; Schafer and Kornbluth, 2006). Le cytochrome C est considéré comme le marqueur principal de la voie intrinsèque des invertébrés et vertébrés. Une fois dans le cytoplasme, il s'attache à l'Apaf-1 (Apoptose protease-activating factor-1) et forme l'apoptosome qui recrute la procaspase 9 (Etape 3, figure 18). Le clivage ATP dépendant de la procaspase 9 est le signal de l'activation des caspases effectrices et donc des changements morphologiques de la cellule (Etapes 4 et 5 figure 18). Cette étape peut être inhibée par des protéines de la famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) pouvant donc arrêter l'apoptose. Il existe de nombreuses étapes et protéines permettant de réguler l'apoptose, mais nous n'entrerons pas davantage ici dans les détails. La cascade d'activation des caspases exécutrices va provoquer le démantèlement de la cellule, ainsi que l'activation du DFF (DNA Fragmentation Factor) responsable de la fragmentation de l'ADN.

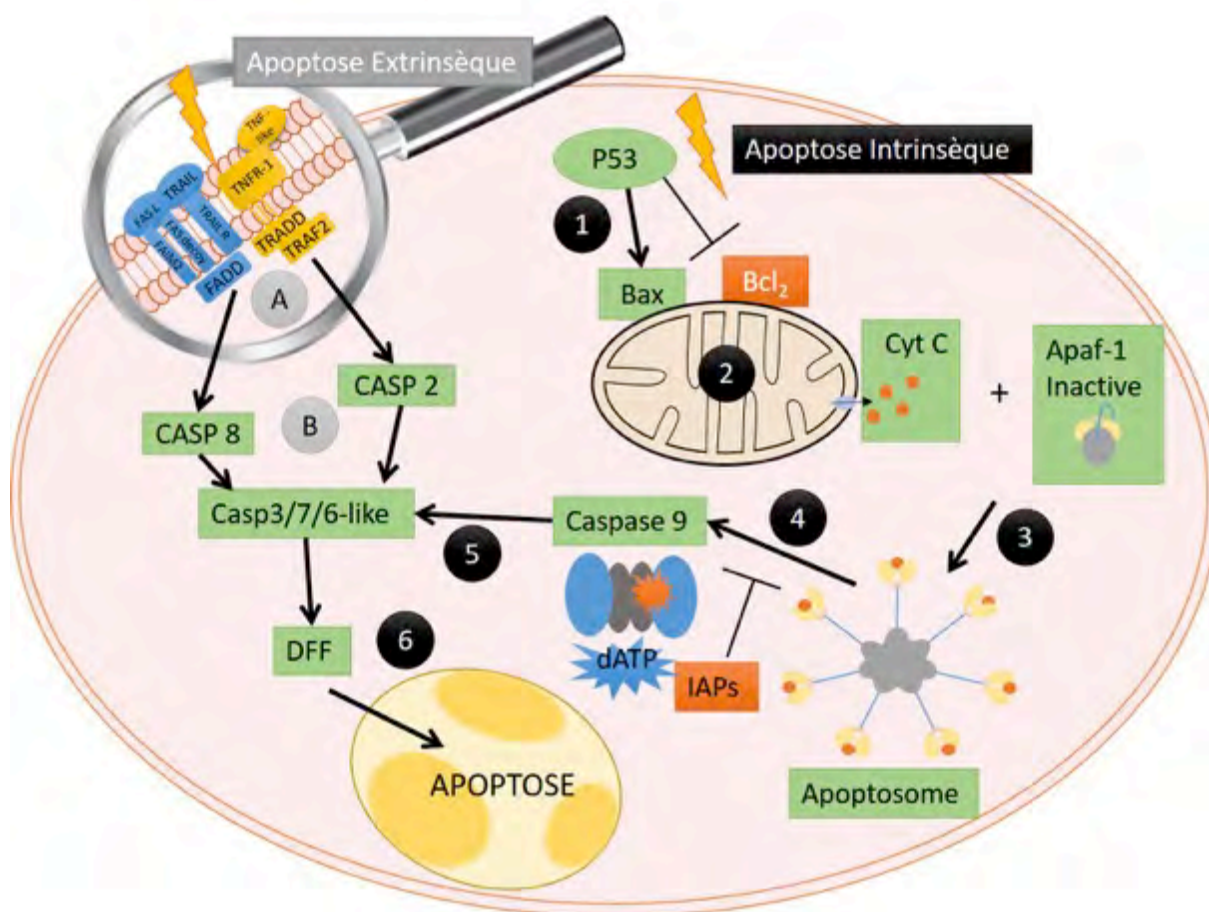


Figure 18 : Schéma simplifié représentant les deux voies de l'apoptose chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Adapté d'après (Romero *et al.*, 2015))

#### 1.1.5.2.1.5 La voie extrinsèque

Le signal provoquant l'apoptose de la cellule peut venir du milieu extracellulaire *via* des récepteurs membranaires nommés TNF (Tumor Necrosis Factor) ou récepteur de la mort, nombreux chez les mollusques (Romero *et al.*, 2015). Ces récepteurs transmettent du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire le signal de la mort cellulaire. Des protéines adaptatrices telles que FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et TRADD (Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein) font le lien entre les récepteurs (Etape A figure 18) et les caspases initiatrices qui sont, dans le cas de *Mytilus galloprovincialis*, les caspases 2 et 8 (Etape B figure 18). Ces protéines adaptatrices vont provoquer la dimérisation des monomères de caspases initiatrices inactives dans le cytoplasme, lesquelles vont ensuite activer les caspases effectrices (Caspases 3/6/7) en clivant l'interdomaine. Ces

caspases vont alors démanteler la cellule qui ne pourra plus faire marche arrière. Les caspases démantèlent la cellule en dégradant les protéines du cytosquelette et provoquent la fragmentation de l'ADN. La cellule va se diviser en corps apoptotiques comme dans la voie intrinsèque, les deux voies ne pouvant être différenciées morphologiquement. Ce phénomène se déroule sans inflammation de la cellule ni perméabilisation de la membrane plasmique contrairement à la nécrose. L'apoptose est une voie qui est extrêmement régulée et fait intervenir de nombreux acteurs qui ne sont pas tous décrits dans ce document.

Une cellule qui rentre dans la voie de l'apoptose peut s'en extraire et peut même l'éviter grâce à l'aide de l'autophagie.

#### 1.1.5.2.2 L'autophagie

L'autophagie est un processus intracellulaire de dégradation d'une partie du cytoplasme de la cellule *via* la voie lysosomale (Klionsky, 2007). Au cours de l'autophagie, la capture d'une partie du cytoplasme commence par la formation d'un phagophore qui se développe pour former un autophagosome limité par une double membrane (figure 19). Cet autophagosome fusionne avec un lysosome qui fournit les hydrolases acides nécessaires à la digestion du cytoplasme prisonnier. Ce processus activé en condition de stress comme le jeûne, peut permettre à la cellule de survivre et d'éviter l'apoptose en recyclant une partie de son cytoplasme. L'inhibition de l'enzyme TOR (Target Of Rapamycin), connue pour réguler la prolifération cellulaire, par la rapamycin lors d'un jeûne induit l'autophagie, ce qui fait de TOR le régulateur principal de l'autophagie (Klionsky, 2007). L'apoptose et l'autophagie sont en constante « conversation » *via* des protéines de la famille des Bcl-2 pouvant faire pencher la balance vers l'un des deux processus, qui s'inhibent l'un l'autre (Levine et al., 2008). Mais l'autophagie, mécanisme qui permet dans certains cas d'éviter la mort par apoptose, peut devenir trop importante dans la cellule et peut au final provoquer sa mort (Chen et al., 2010; Kang et al., 2011; Maiuri et al., 2007).

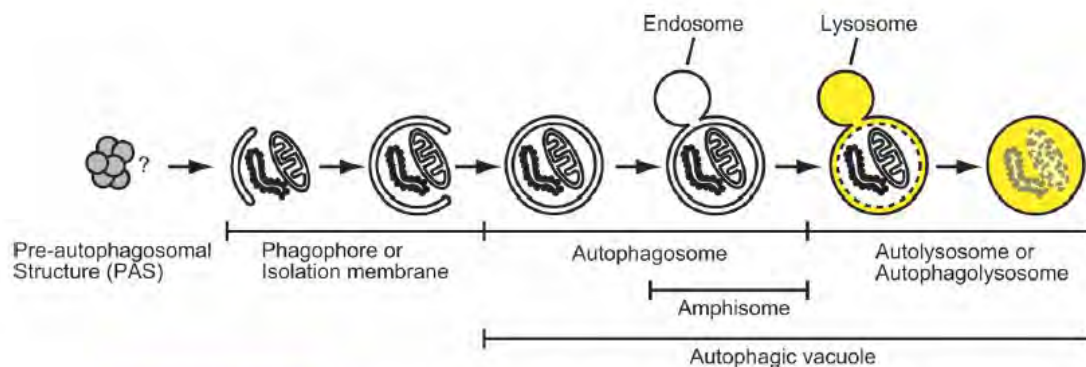


Figure 19 : Schéma du processus d'autophagie. Une portion de cytoplasme incluant des organites est enfermée par une membrane. Cet autophagosome fusionne avec un endosome afin de digérer le contenu (Mizushima, 2007).

#### 1.1.5.2.3 La nécrose

Contrairement à l'apoptose et à l'autophagie, la nécrose est un type de mort cellulaire qui n'est pas régulé, mais résulte d'un traumatisme physique. Alors que l'apoptose est sans réaction inflammatoire, la nécrose provoque une inflammation locale *via* des caspases inflammatoires (différentes des caspases de l'apoptose). La nécrose est caractérisée par une désintégration relativement lente de la cellule, sans les caractéristiques typiques indiquant une mort cellulaire active (réaction ATP dépendante, caspase-3 active,..). La nécrose est un processus considéré comme toxique, où la cellule est une victime passive, et qui peut affecter de grandes zones de tissus. La membrane plasmique est rompue, car la cellule enfle, les organites du cytoplasme se dilatent et la condensation de la chromatine est modérée par rapport à l'apoptose. (Abraham and Shaham, 2004 ; Golstein and Kroemer, 2007; Kroemer et al., 2005, 2009).

#### 1.1.5.2.4 De la mort cellulaire programmée aux morts cellulaires régulées

L'apoptose, la nécrose et l'autophagie ont longtemps été décrites comme les trois chemins possibles vers la mort de la cellule. L'apoptose était nommée mort cellulaire de type I ou « la » mort cellulaire programmée, l'autophagie, mort cellulaire de type II, et la nécrose de type III. Cette dernière décennie, la recherche sur la mort cellulaire a énormément progressé et de nombreux nouveaux procédés, ou types de morts cellulaires, ont été découverts (Galluzzi *et al.*, 2018).

Ainsi, la nécrose peut, dans certains cas, être régulée et non pas accidentelle et incontrôlable. Elle est régulée par les protéines RIPK3 (Receptor Interacting Protein Kinase-3) et MLKL (Mixed Lineage Kinase Like) et peut être induite *via* des récepteurs membranaires et par des

censeurs intracellulaires. Même si elle présente les caractéristiques morphologiques de la nécrose, en particulier la perméabilisation de la membrane cytoplasmique, il est apparu nécessaire de lui attribuer un autre nom. Ce nouveau type de mort cellulaire régulée a donc été nommé **nécroptose** (Pasparakis and Vandenabeele, 2015).

D'autres recherches ont découvert de nouvelles voies d'activation de l'apoptose dont l'**apoptose caspase-indépendante**, l'activation par des anticorps, ou par des lysosomes, etc. (Abraham and Shaham, 2004 ; Galluzzi et al., 2018). Du côté de l'autophagie, des découvertes ont été faites comme l'**autosis** qui est un type de mort cellulaire accompagné par de l'autophagie, mais qui n'est pas responsable de l'activation de la mort de la cellule (Liu and Levine, 2015 ; Muñoz-Pinedo and Martin, 2014). Depuis 2005, un comité de nomenclature des morts cellulaires (The Nomenclature Committee on Cell Death) a été mis en place. Régulièrement, une revue est publiée afin de proposer des critères uniques pour la définition des différents types de morts cellulaires et de leurs morphologies. Ce comité a aussi mis en garde contre l'abus de mots et de concepts qui « ralentissent les progrès dans le domaine de la recherche sur la mort cellulaire » (Galluzzi et al., 2012, 2015, 2018; Kroemer et al., 2005, 2009). Une de leur recommandation est de ne plus parler de l'apoptose comme d'une mort cellulaire programmée, mais de **mort cellulaire régulée** (Galluzzi *et al.*, 2012). En effet, le terme « programmé » ne devrait être utilisé que dans le contexte du développement embryonnaire ou de l'homéostasie d'un tissu cellulaire. Ci-dessous dans le tableau 2 sont regroupés les quatorze types de morts cellulaires régulées répertoriées en janvier 2018 par le comité. Les recherches dans ce domaine avancent rapidement ces dernières années, mais elles sont essentiellement menées sur les mammifères et peu de choses sont connues sur ces différentes voies chez les mollusques que nous étudions au cours de cette thèse, et il est difficile de plaquer directement cette nomenclature sur d'autres organismes.

Tableau 2 : regroupant les différents types de mort cellulaire régulées (Kroemer *et al.*, 2005, 2009; Boya and Kroemer, 2008; Galluzzi *et al.*, 2012, 2015, 2018; Kepp *et al.*, 2014; Muñoz-Pinedo and Martin, 2014; Liu and Levine, 2015; Pasparakis and Vandenabeele, 2015). ‘ – ’= non renseigné.

Nom	Morphologie cellulaire	Fragmentation ADN	Casp 3	Activé par	Décrit chez
Intrinsic apoptosis	Apoptotique	oui	oui	Perturbations intracellulaires, arrêt du facteur de croissance, ADN endommagé, stress du réticulum endoplasmique, ROS, altération des microtubules,...	Vertébrés et invertébrés
Extrinsic apoptosis	Apoptotique	oui	oui	Perturbations extracellulaires détectées par des récepteurs de la membrane plasmique	Vertébrés et invertébrés
MPT(Mitochondrial Permeability Transition)-driven necrosis	Nécrotique	–	–	Perturbation de la perméabilité de la membrane des mitochondries provoquée par un stress oxydatif ou la présence de Ca <sup>2+</sup> cytosolique.	Cellules neuronales, cardiaques et reinales
Necroptosis	Nécrotique	–	non	Nécrose programmée impliquée dans la parthogénose de nombreuses maladies	mammifères
Ferroptosis	Nécrotique mais avec un rétrécissement des mitochondries	–	non	Perturbations oxydatives du milieu intracellulaire	Cellules neuronales
Pyroptosis	Noyau apoptotique mais perméabilisation de la membrane plasmique comme la nécrose	–	oui	Perturbation de l'homéostasie extra ou intracellulaire relié à l'immunité innée (exemple invasion de pathogène)	–

Nom	Morphologie cellulaire	Fragmentation ADN	Casp 3	Activé par	Décrit chez
Parthanatos	Nécrotique	oui	non	mort de la cellule causée une exposition prolongée aux dommages de l'alkylation de l'ADN, stress oxydatif, hypoxie, hypoglycémie ou des signaux inflammatoires	–
Entotic cell death	Phagocytose	–	–	Cannibalisme de cellule par des cellules non-phagocytiques	mammifères
NETotic cell death	Perte de l'intégrité du noyau et décondensation massive de la chromatine.	–	–	NET sont des plateformes extracellulaires qui piègent et dégradent les microbes. Mort de la cellule causée par des ROS.	Cellule neutrophile de mammifère
Lysosome-dependent cell death	Apoptotique ?	–	oui	Causée par la perméabilisation de la membrane des lysosomes (involution des glandes mammaires après lactation, neurodégénération, désordre cardiovasculaire, vieillissement, ...)	Mammifères
Autophagy-dependent cell death	Elargissement du Golgi, des mitochondries et parfois du ER Perméabilisation et bourgeonnement de la membrane, changements mineurs de nombreux autophagosomes et autolysosomes	–	–	Mort de la cellule à cause d'une autophagie excessive de la cellule (à ne pas confondre avec l'Autosis)	Levures, vertébrés, invertébrés,...



Nom	Morphologie cellulaire	Fragmentation ADN	Casp 3	Activé par	Décrit chez
Immunogenic cell death	Apoptotique	oui	Oui	Active par un antigène endogène ou exogène	Homme
Anoikis	Apoptotique	oui	oui	Variante de l'apoptose intrinsèque initialisée par la rupture de l'interaction entre la matrice extracellulaire et les intégrines (récepteurs d'adhésion cellulaire).	_
Autosis	Nombre important d'autophagosomes/ autolysosomes, mitochondries avec des structures internes anormales qui se dilatent, ER se dilate puis se fragmente avant de disparaître Perméabilisation de la membrane plasmique rétrécissement de la membrane nucléaire	_	_	Mort de la cellule accompagnée et non pas causée par l'autophagie	_

Dans la mesure du possible, nous nous sommes donc efforcés de tenir compte des recommandations récentes concernant la nomenclature, mais ce n'est pas évident puisqu'elle est basée sur des travaux chez les mammifères.

Dans les parties précédentes, les mécanismes de régulation de la symbiose chez 6 modèles ont été abordés et comparés, faisant ressortir la diversité des raisons qui rendent nécessaire la régulation, mais la relative unicité des mécanismes. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à la régulation de la symbiose chez les bathymodiales, un groupe qui constitue un exemple de symbiose nutritionnelle impliquant une faible diversité de symbiotes, mais une forte densité qui contribue à l'adaptation de l'hôte à un environnement extrême.

## 1.2 LES BATHYMODIOLES ET LEURS ENVIRONNEMENTS EXTREMES

### 1.2.1 Les milieux de vie des bathymodioles

#### 1.2.1.1 Les sources hydrothermales, milieux toxiques et chaotiques

Les sources hydrothermales sont présentes dans tous les océans du monde de l'Arctique à l'Antarctique, en passant par l'Océan Indien, Pacifique et Atlantique (figure 22).

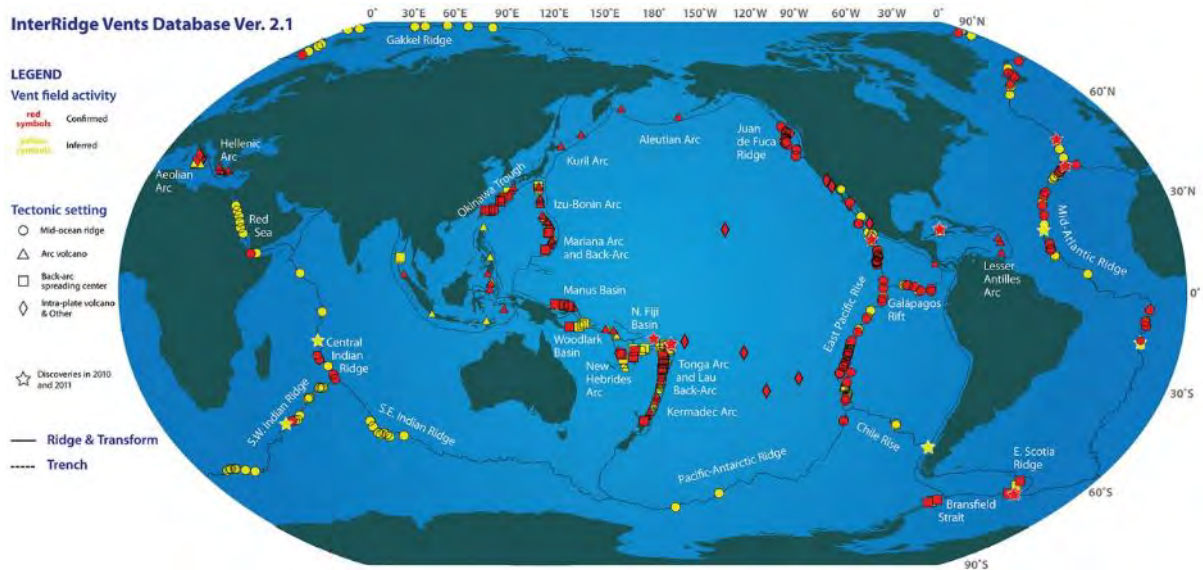


Figure 20 : Carte des sites hydrothermaux connus en 2011. Crédit : S. Beaulieu, K. Joyce, J. Cook, and S.A. Soule, Woods Hole Oceanographic Institution, 2015; funding from Woods Hole Oceanographic Institution, U.S. National Science Foundation #1202977, and InterRidge.

Elles ont été découvertes en 1977 par des géologues qui étudiaient la tectonique des plaques sur la dorsale des Galápagos (Corliss *et al.*, 1979). Dans les zones d'accrétion du plancher océanique et les zones de subduction, lieux de fortes activités volcaniques et tectoniques, l'eau de mer circule à travers un réseau de fissures dans la croûte océanique et réagit avec les roches basaltiques surchauffées (Alt, 1995). De nombreux échanges physico-chimiques, sous l'influence des fortes pressions et des températures élevées, transforment l'eau de mer en un fluide acide (pH 1.5-5), chaud (jusqu'à 356°C pour les cheminées du site Rainbow (Douville *et al.*, 2002)), anoxique et chargé en composés réduits tels que les sulfures, le méthane ou l'hydrogène ainsi qu'en éléments métalliques tels que  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ (tableau 4).

Tableau 3 : Minéraux et gaz dans les fluides purs sortant des cheminées de 3 sites de la ride Médio-Atlantique en comparaison avec l'eau de mer du fond. Extrait de Charlou *et al.*, 2002.

Site	Eau de mer	Menez Gwen	Lucky Strike	Rainbow
Profondeur (m)		850	1700	2300
T (°C)	2	275-284	170-364	365
pH	7.8	4.2-4.3	3.5-3.7	2.8
H <sub>2</sub> S (mM)	0	<1.5	2.5-3	1.2
CH <sub>4</sub> (mM)	0.0003	1.35-2.63	0.5-0.97	2.5
H <sub>2</sub> (mM)	0.0004	0.024-0.048	0.02-0.73	16
Fe (μM)	<0.001	<2 -18	30-863	24050
Cu (μM)	0.007	0.6-3	4-26	121-162
Si(OH) <sub>4</sub> (mM)	< 0.2	7.7-11.6	11.5-16.3	6.9
Cl (mM)	546	357-381	422-533	750
Br (μM)	838	666-710	735-924	1178
SO <sub>4</sub> (mM)	28.2	0	0	0
Na (mM)	464	312-319	347-446	553
Li (μM)	26	238-274	278-357	340
K (mM)	9.8	22.1-23.8	21.1-26.7	20.4
Rb (μM)	1.3	20.3-29.4	22.7-39.1	36.9
Cs (nM)	2.3	330	200-280	333
Mg (mM)	53	0	0	0
Ca (mM)	10.2	29.7-33.1	31.3-38.2	66.6
Sr (μM)	87	100-111	67-119	200
Ba (μM)	0.14	>12	10-52	>67
Mn (μM)	< 0.001	59-71	84-446	2250
Zn (μM)	0.01	2.4-4.3	5-57	115-185

Ce fluide hydrothermal remonte et jaillit comme un geyser, ou bien diffuse à travers les roches poreuses pour se mélanger avec l'eau de mer froide (2°C) et oxygénée, provoquant la précipitation de certains minéraux et la formation de cheminées au niveau des points de sortie du fluide (figure 23) (Lalou, 1991).

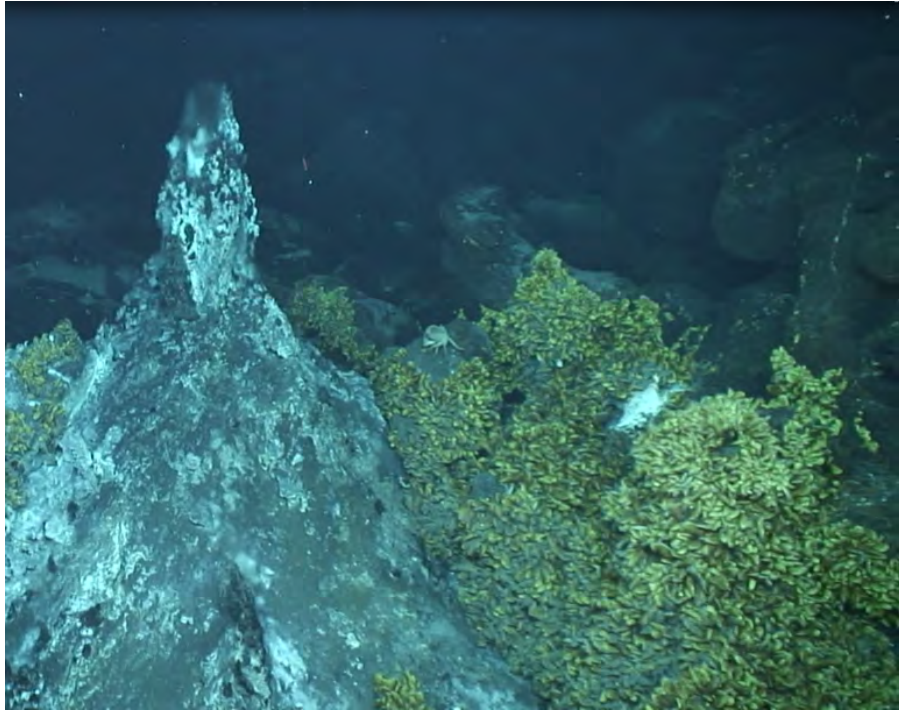


Figure 21 : Photo d'une cheminée hydrothermale et de la moulière à sa base. Prise à Menez Gwen Station White Flame lors de la Campagne MOMARSAT/BioBaz 2017. © IFREMER

En fonction de l'intensité des émissions du fluide, de l'eau de mer en sub-surface et de la composition des roches sous-jacentes, les paramètres physico-chimiques du fluide, la composition et la forme des cheminées ou des diffuseurs varient selon les sites et évoluent au fil du temps (tableau 4) (Tivey *et al.*, 1995). La durée de vie d'une sortie de fluide varie d'une à plusieurs décades. A l'échelle d'un site d'émission, la durée d'activité dépend du type de volcanisme et de la vitesse de la dorsale. Au fur et à mesure du temps, l'activité peut décroître jusqu'à l'extinction de la cheminée, provoquant la disparition de la faune associée (Tunnicliffe, 1991; Shank *et al.*, 1998). L'habitat des organismes (par exemple les moules) se situe dans la zone de mélange entre fluide hydrothermal et eau de mer, dans des conditions intermédiaires issues du mélange entre les deux. Cette zone présente des caractéristiques variables dans l'espace (distance des sorties de fluides, topographie) et dans le temps (courants, pics d'activité). Il s'agit d'une interface dynamique dont les variations intenses mettent à rude épreuve les organismes (figure 24).

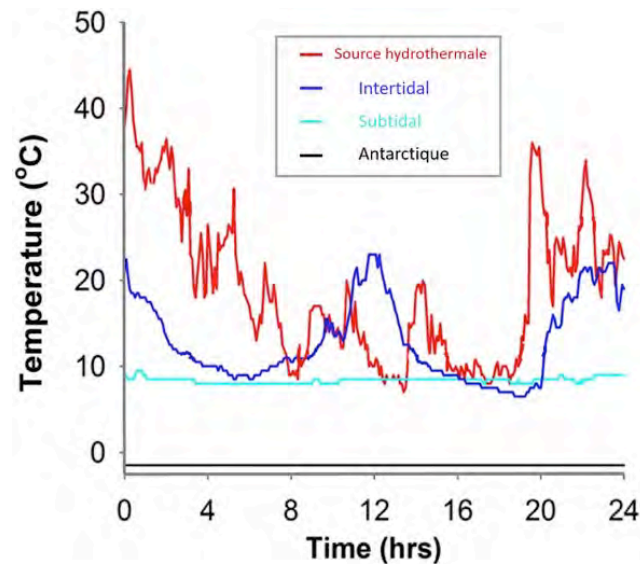


Figure 22 : Enregistrement de la température à un intervalle de 10 min pendant 24h dans 4 habitats aquatiques différents. En rouge, un habitat proche d'une sortie de fluide montrant la grande amplitude et l'aspect chaotique des variations. Adapté d'après (Bates *et al.*, 2010).

Au delà des extrêmes de température (lié à la circulation de fluide), de pression (lié à la profondeur) et de la toxicité des fluides (par exemple l'H<sub>2</sub>S ou les métaux), c'est en raison de cette forte variabilité spatio-temporelle que les sources hydrothermales sont considérées comme l'un des habitats les plus extrêmes de notre planète. Lors de la mise en place d'une nouvelle source hydrothermale, la première communauté qui s'installe est dominée par les vestimentifères puis, à mesure que les flux de sulfures diminuent, cette communauté est progressivement remplacée par les bathymodiales (Hessler *et al.*, 1988). Lors de l'extinction d'une source hydrothermale, les bathymodiales sont les dernières espèces présentes grâce à la mixotrophie (Raulfs *et al.*, 2004).

### **1.2.1.2 Les sources de fluides froids ou suintements froids, milieux toxiques mais plus stables**

Les premières zones de sources de fluides froids ont été découvertes après les sources hydrothermales en 1983 (Paull *et al.*, 1984). Elles sont situées sur des marges continentales actives ou passives, qui représentent les zones de transition entre le domaine continental peu profond (100-200m) et le domaine océanique profond (4000-6000m), souvent le long du bord des talus continentaux. On les nomme sources de fluides froids en opposition aux sources hydrothermales, où le fluide peut atteindre 450°C, alors que dans le cas des suintements on ne détecte généralement pas d'anomalies de température, tout au plus 1-3°C de différence avec celle de l'eau du fond. Le site Regab d'où proviennent les échantillons de *Bathymodiolus aff. boomerang* est ainsi situé sur la marge passive du Congo- Angola- Zaïre. Au pied du talus

continental, la matière organique charriée des grands fleuves, tel le fleuve Congo, s'accumule et est enfouie. Sous l'action de la pression et de la température, mais aussi de certains procaryotes, la matière organique est transformée en méthane et en hydrocarbures à chaîne plus longue (ces derniers pouvant constituer des réservoirs d'hydrocarbures dans le sous-sol), et secondairement le sulfate de l'eau de mer est réduit en sulfures par des bactéries du sédiment, conduisant à un environnement particulièrement riche en méthane et en sulfure d'hydrogène (Boetius *et al.*, 2000). Le terme « suintements » (seeps) traduit une migration lente du fluide réduit à travers le sédiment vers l'interface avec l'eau de mer (Sibuet and Olu, 1998; Sibuet and Roy, 2002). Les moules qui s'y trouvent sont exposées à ces suintements, dans des pockmarks (figure 25), qui sont des dépressions circulaires causées par la remontée des fluides (Kelley *et al.*, 1994; Savoye *et al.*, 2009), et qui présentent des roches carbonatées formées localement (*i.e.* carbonates authigéniques).

La durée de vie des sites de fluides froids est souvent supérieure à celle des sources hydrothermales, permettant l'installation d'une faune plus diversifiée. Néanmoins, une importante variabilité spatio-temporelle existe tout de même dans ces sites qui ne doit pas être ignorée (Boetius *et al.*, 2000).



Figure 23 : Photo d'un pockmark du site REGAB montrant des hydrates de méthane sur lesquels reposent des *Bathymodiolus aff boomerang* lors de la campagne WACS 2011 © IFREMER

En dépit de leur origine géologique différente, les sources hydrothermales et les fluides froids ont quelques caractéristiques communes. Les fluides présents sont riches en sulfures et/ou méthane, des composés réduits, qui sont peu favorables pour les formes de vie de grande taille et aérobies, que nous connaissons (animaux par exemple, pour lesquels les sulfures sont toxiques pour les chaînes respiratoires mitochondriales, et les hémoglobines quand ils y en ont). L'absence de lumière rend impossible la photosynthèse, ce qui a laissé penser que la production primaire y était impossible. Paradoxalement pourtant, autour des cheminées des sources hydrothermales prolifère une faune variée de plus de 500 espèces appartenant à au moins 12 phylums animaux (Desbruyeres *et al.*, 2006). La base de ces écosystèmes repose sur les procaryotes. Archeae et bactéries extrémophiles prolifèrent en utilisant les composés réduits du fluide, desquels ils tirent l'énergie nécessaire à une production primaire qui, reposant sur des réactions chimiques et non sur la lumière, est nommée chimioautotrophie ou chimiosynthèse. La faune a noué au cours de l'évolution des symbioses avec certaines des bactéries chimiosynthétiques qui assurent tout ou une partie de la nutrition de leurs hôtes, et/ou se nourrit des tapis microbiens, et/ou consomme les animaux qui se développent dans cet écosystème (figure 26). Les trois quarts des espèces des sources hydrothermales sont des animaux symbiotiques, démontrant l'importance de ces associations dans cet environnement hostile (Desbruyeres *et al.*, 2006). Il en va de même au niveau des sources de fluides froids, dans lesquelles on rencontre également une biomasse majoritaire d'animaux symbiotiques, souvent apparentés aux espèces des sources hydrothermales. Les bathymodioles vivent ainsi dans ces deux types d'environnements hostiles grâce aux bactéries chimiosynthétiques avec lesquelles elles s'associent, et y atteignent des biomasses considérables qui font d'elles l'un des groupes dominants, et les plus étudiés.



Figure 24 : Réseau trophique d'une source hydrothermale représenté par 4 voies majeures (flèches vertes). Les bactéries utilisent l'énergie chimique des composés réduits des fluides comme le méthane et le sulfure d'hydrogène. Le plancton et les particules qui tombent, servent de nourriture aux suspensivores. Les bactéries chimiosynthétiques forment un tapis bactérien qui peut être consommé par les gastéropodes. D'autres bactéries chimiosynthétiques vivent en symbiose avec les vers tubicoles, les bivalves et les gastropodes qu'elles nourrissent. Les bactéries fournissent en échange du carbone à leur hôte. Puis les hôtes servent de nourriture aux prédateurs tels que les crabes, les poissons et les polychètes (Tunnicliffe, 1992).

### 1.2.2 Les bathymodiales et leurs symbioses diverses et flexibles : des organismes modèles

L'étude de la symbiose chez des modèles relativement simples, *i.e.* présentant par exemple une faible diversité de symbiotes en comparaison par exemple du microbiote des vertébrés, est nécessaire afin de mieux comprendre et découvrir les mécanismes en jeu. C'est pourquoi l'étude de la symbiose chez les invertébrés est une solution (Petersen and Osvatic, 2018). Les invertébrés possèdent un système immunitaire plus simple qui facilite l'étude de la relation entre le symbiote et son hôte. Pour étudier comment la quantité de symbiotes à l'intérieur de l'hôte est régulée et quels sont les mécanismes en jeu, un modèle avec moins de partenaires est utile. Les bathymodiales étudiées lors de cette thèse possèdent deux types de symbiotes principaux, chacun présent en grand nombre. Elles ont été bien étudiées car elles atteignent, grâce à leur symbiose, des fortes biomasses dans des environnements particulièrement hostiles



et variables autour des sources hydrothermales et de fluides froids. Depuis des années, les variations de la quantité de bactéries à l'intérieur des branchies de bathymodiales sont ainsi étudiées et documentées, avec des techniques fiables permettant de quantifier et de localiser ces bactéries. C'est pour cette raison que ces moules sont un bon modèle d'étude des mécanismes permettant la variation de la quantité de bactéries. Les bathymodiales sont aussi phylogénitiquement proches des moules côtières ne possédant pas de symbiotes, et qui peuvent servir de modèle de comparaison. Les outils permettant de conserver et d'expérimenter sur des moules à la pression du fond, disponibles depuis une dizaine d'années, rendent ces modèles accessibles à l'expérimentation. Certaines bathymodiales peuvent par ailleurs être récoltées sur les sites les moins profonds et être maintenues pendant de longues périodes de temps à la pression atmosphérique.

Les variations de densité de symbiotes ont été étudiées principalement chez les bathymodiales du genre *Bathymodiolus*. La densité des deux types de symbiotes de *Bathymodiolus azoricus* et *B. puteoserpentis* varie en fonction des composés disponibles dans l'environnement. Cette flexibilité serait la clé de leur succès écologique. De premières pistes (Guezi *et al.*, 2014) semblent indiquer que l'apoptose pourrait jouer un rôle dans la diminution de la quantité de symbiotes. Les bathymodiales acquièrent leurs symbiotes dans l'environnement lors du stade juvénile (Wentrup *et al.*, 2013; Laming *et al.*, 2015).

Les moules, mollusques de la classe des Bivalves et de la famille des Mytilidae, sont présentes dans tous les écosystèmes marins, des milieux côtiers aux abysses. Les espèces de moules des grandes profondeurs, découvertes autour des sources hydrothermales et des suintements froids, peuvent atteindre de grandes tailles (longueur de coquille atteignant 36 cm chez *Bathymodiolus boomerang* (Cosel and Olu, 1998). Elles appartiennent à la sous-famille des Bathymodiolinae (Kenk and Wilson, 1985; Thubaut *et al.*, 2013). Elles ont été découvertes en 1977, en même temps que les premières sources hydrothermales (Corliss *et al.*, 1979; Kenk and Wilson, 1985). Ces bathymodiales vivent en symbiose avec des bactéries et colonisent des milieux tels que les bois coulés, les os de baleines, les sources hydrothermales et les sources de fluides froids (Duperron, 2010). Ces Bathymodiolinae constituent une sous famille différente de celles dont font partie les moules côtières dont *Mytilus edulis* (qui appartiennent à la même famille des Mytilidae). Le scénario évolutif proposé pour l'origine des Bathymodiolinae suppose une origine côtière, suivie d'une spécialisation vers les environnements profonds hydrothermaux et de fluides froids *via* des formes intermédiaires ayant colonisé bois coulés et carcasses de baleine (Little and Vrijenhoek, 2003, Distel *et al.* 2000). Cette spécialisation est concomitante à

l'acquisition de bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes au niveau des branchies, dont semblait être pourvu l'ancêtre commun des Bathymodiolinae (Duperron *et al.*, 2009). Cette parenté rend particulièrement intéressante la comparaison entre moules symbiotiques (Bathymodiolinae) et non-symbiotiques (Mytilinae et autres sous-familles de Mytilidae) (figure 20).

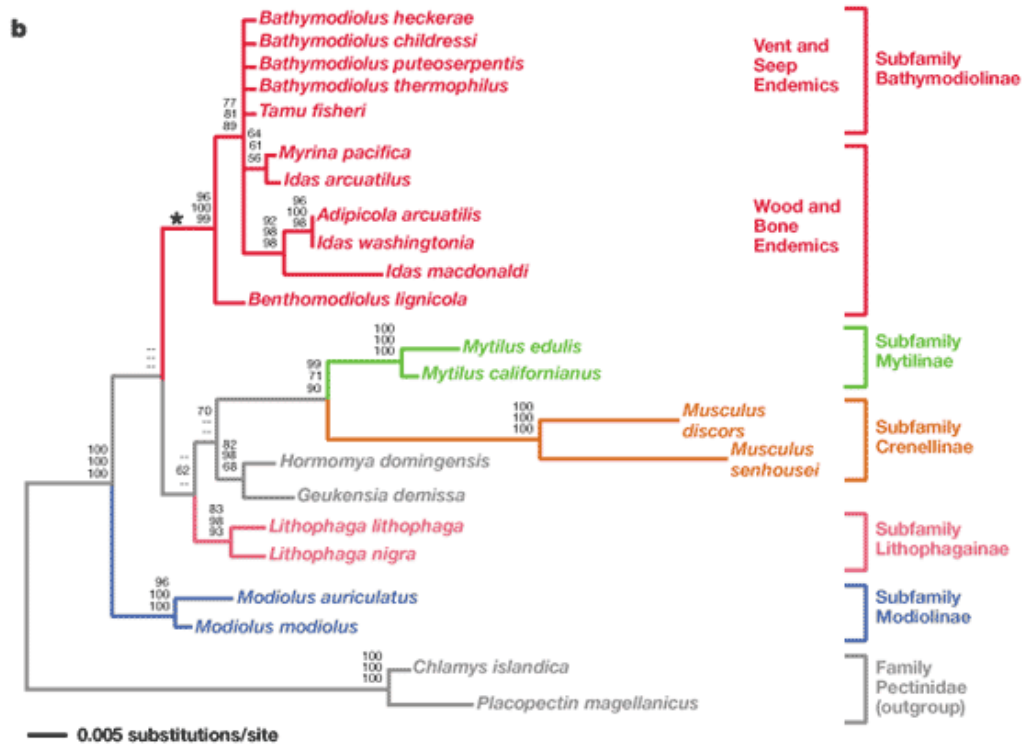


Figure 25 : Relations phylogénétiques entre espèces de moules et lien avec leurs habitats. Les moules des sources hydrothermales, des suintements froids, des bois coulés et des carcasses figurent en rouge, et en vert les *Mytilinae* comprenant les moules côtières *Mytilus edulis* (Distel *et al.*, 2000).

Le genre *Bathymodiolus* est lui-même polyphylétique. Il compte 24 espèces et peut être subdivisé en 3 clades : celui de *B. childressi* (L4), *B. aduloides* (L6) et *B. thermophilus* (L2) qui se sont séparés il y a environ 30 millions d'années (figure 21) (Lorion *et al.*, 2013) et dispersés à travers les océans et mers du monde (Olu-Le Roy *et al.*, 2007; Lorion *et al.*, 2013) . Le clade de *B. thermophilus*, première espèce décrite ayant donné son nom au genre, peut être considéré comme le groupe des *Bathymodiolus* (*sensus stricto*) et c'est à ce clade qu'appartiennent les trois espèces que nous avons choisi d'étudier pour ces travaux : *Bathymodiolus azoricus*, *B. puteoserpentis* et *B. aff boomerang*. Par commodité, nous les désignerons sous le terme de « bathymodioles ». Nos espèces sont donc très proches, en particulier *B. azoricus* et *B. puteoserpentis* qui peuvent s'hybrider sur certains sites de la dorsale Médio-Atlantique (O'Mullan *et al.*, 2001).

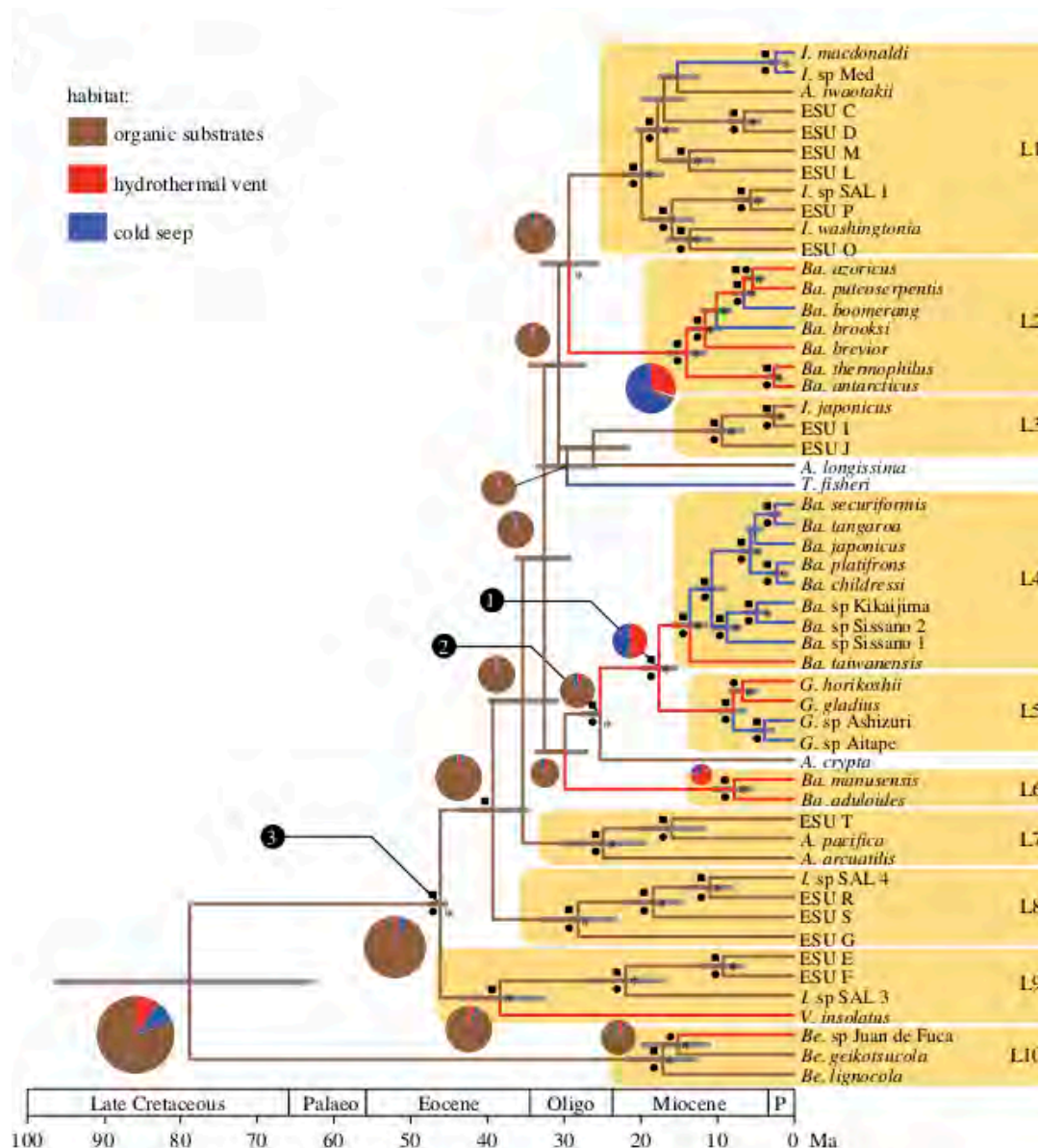


Figure 26: Arbre Phylogénétique des moules chimiosynthétiques des abysses (Lorion *et al.*, 2013).

*Bathymodiolus azoricus* peut atteindre 15 cm dans sa plus grande longueur. Elle domine la macrofaune des sources hydrothermales sur plusieurs sites dont Menez Gwen, Lucky Strike et Rainbow situés entre 850 et 3350m de profondeur (Von Cosel *et al.*, 1999). *B. puteoserpentis* (Cosel *et al.*, 1994) vit également sur la dorsale médio-Atlantique sur les sites hydrothermaux de Broken Spur, TAG, Snake Pit et Logatchev, entre 3000 et 3510m. Enfin, *Bathymodiolus boomerang* colonise les sources de fluides froids que l'on trouve du Golfe de Guinée à la Barbade (Olu-Le Roy *et al.*, 2007), souvent associée à des dépressions ou « pockmarks »

contenant des sédiments fins et des croûtes carbonatées. *B. boomerang* est la plus grande moule connue aujourd'hui dans le monde (sa coquille peut atteindre jusqu'à 36 cm) (tableau 3).

Chacune des trois espèces peut former des moulières importantes dans les zones profondes aux alentours des sources hydrothermales ou des sources de fluides froids. La densité peut varier entre 0.09-1.5 et 400-700 individus par m<sup>2</sup>. Et les moulières peuvent couvrir des surfaces de plusieurs centaines de mètres carrés (Colaço *et al.*, 1998).

Tableau 4 : Tableau regroupant les différentes espèces de moules étudiées pendant la thèse (Duperron, 2010; Hayward *et al.*, 2014).

Espèce	Site	Types de symbiotes principaux	Habitat	Profondeur
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	MAR: Menez Gwen Lucky strike Rainbow Broken Spur Lost city	SOX et MOX	Source hydrothermale	De 840 à 3350m
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	MAR: Broken Spur Snake pit Logatchev TAG	SOX et MOX	Source hydrothermale	De 3000 à 3510m
<i>Bathymodiolus aff. boomerang</i>	Golfe de guinée : Regab, Mer des caraïbes : Prisme d'accrétion des Barbades,	SOX et MOX	Suintement froid	3150m
<i>Mytilus edulis</i>	Roscoff (Europe Nord-ouest)	aucun	Zone cotière	De 0 à 10m

### 1.2.3 Structure et nomenclature de l'organe abritant les symbiotes

Les symbiotes sont localisés dans la branchie des bathymodioles. Comme nous l'avons vu précédemment, pour comprendre le fonctionnement de la symbiose, il est important de bien comprendre la structure et la dynamique de l'organe qui abrite les symbiotes. Une branchie de bathymodiole est constituée de deux feuillettes, eux-mêmes composés chacun d'une lamelle descendante et d'une ascendante, le tout formant un « W » (figure 27 A). Seules les lamelles descendantes sont soudées dorsalement à la masse viscérale (figure 27 B), tandis que les lamelles ascendantes, plus courtes que les descendantes, présentent une extrémité libre. La branchie est de type homorhabdique, *i.e.* qu'elle est composée de filaments tous identiques et parallèles entre-eux (Le Pennec and Hily, 1984; Fiala-Médioni *et al.*, 1986; Fiala-Medioni, 1988). Dans un plan perpendiculaire au «W » formé par les filaments descendants et ascendants (figure 27), les faces extérieures des filaments branchiaux faisant face à la cavité palléale (*i.e.* faces externes basales du « W ») sont nommées faces frontales, tandis que leurs opposées, qui font face aux lamelles internes (*i.e.* faces internes apicales du « W ») sont nommées faces abfrontales. Le long d'une section transversale de la branchie, l'épaisseur d'un filament branchial se structure en 4 zones :

(1) La terminaison ciliée frontale (Fig. 27 C : T. C.) composée de mucocytes et de cellules ciliées qui génèrent un courant d'eau inhalant dans la cavité palléale. Les cellules de cette zone présentent des fortes densités de mitochondries à crêtes très développées, qui attestent d'une activité cellulaire intense (Fiala-Medioni, 1988).

(2) La zone de jonction interfilamentaire (Fig. 27 C : I. F.) composée elle aussi de cellules ciliées qui permettent de maintenir les filaments parallèles entre eux.

(3) L'hémolymphe (Fig. 27 C : H) contenant des hémocytes circulant entre les deux lames basales de la branchie.

(4) La zone des bactériocytes (Fig. 27 C : Z. B.) composée de mucocytes, de cellules intercalaires et de bactériocytes.

D'après diverses observations en FISH, la quantité de bactéries n'est pas la même suivant la localisation du bactériocyte dans l'épaisseur de chaque filament branchial. En effet, les bactériocytes proches de la terminaison ciliée (côté frontal externe du V du filament) sont volumineux et contiennent plus de symbiotes, alors que les bactériocytes proches de la zone interne du V du filament (côté abfrontal) sont très fins et contiennent moins de symbiotes.

Contrairement à la branchie de *Mytilus edulis*, il n'y a pas de cils du côté abfrontal de la branchie chez *Bathymodiolus spp.*

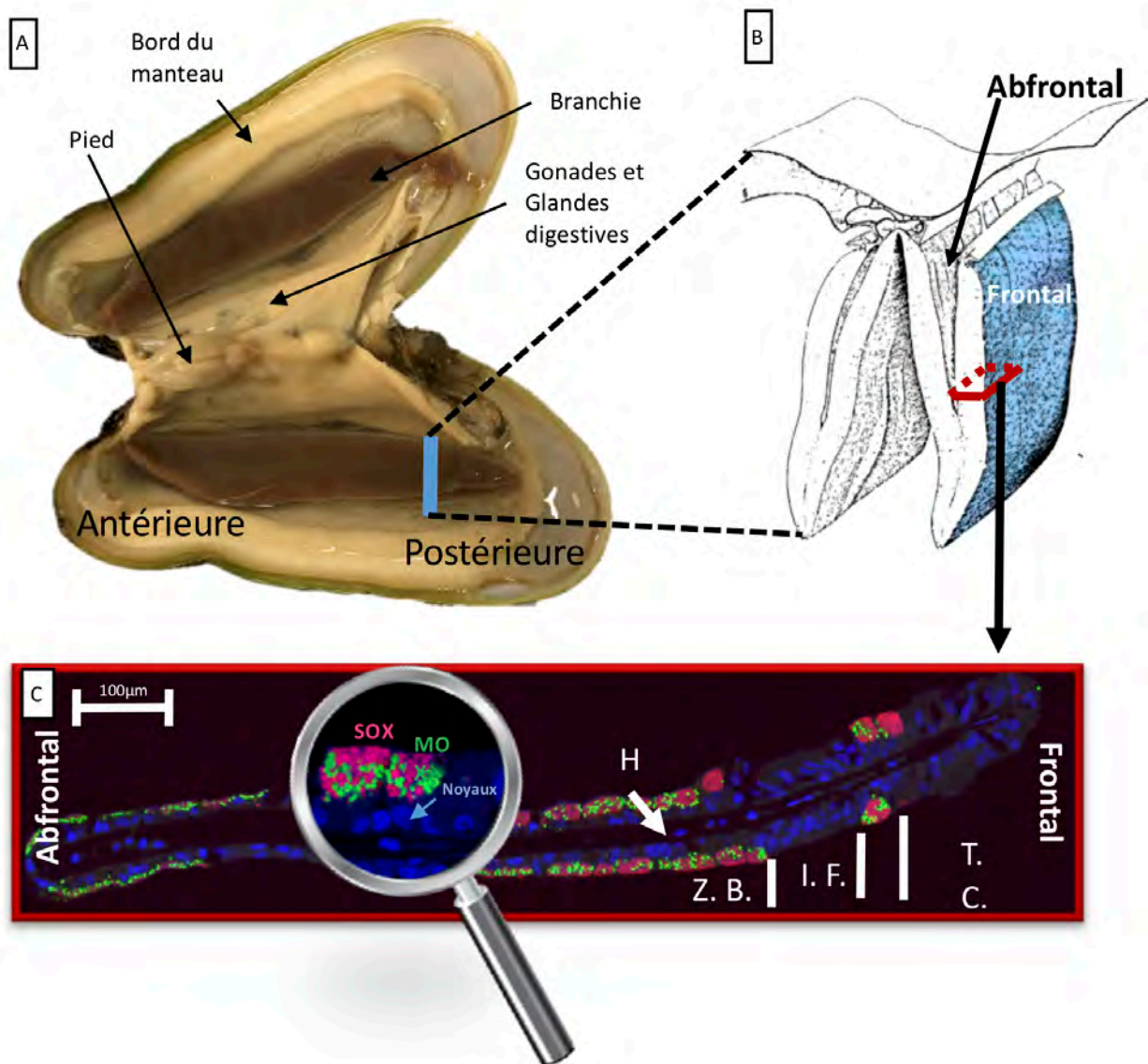


Figure 27 : Détails de la branchie de *Bathymodiolus azoricus* et de ses endosymbiotes. A) Photo de la vue ventrale d'une *Bathymodiolus azoricus* ouverte provenant du site Menez Gwen (-840m) de la Dorsale Médio Atlantique (Campagne BioBaz 2017, Photos Bérénice Piquet). B) Schéma de la branchie d'après (Le Pennec and Hily, 1984) formant un W dont la partie dorsale est soudée aux tissus tandis que la partie ventrale pend dans la cavité palléale. Le carré rouge montre le sens d'une coupe transversale à travers les lamelles branchiales et montrée en C. C : Coupe transversale d'une lamelle branchiale avec la face frontale à droite, et abfrontale à gauche. Le DAPI (bleu) marque les noyaux des cellules, les marquages FISH montrent des bactéries sulfo-oxydantes (SOX, rose) et méthanotrophes (MOX, vert). Abréviations : H = hémolymphe ; IF = zone ciliée interfilaire ; TC = terminaison ciliée ; ZB = zones des bactériocytes.

#### 1.2.4 Nutrition et symbiose chez les bathymodioles du genre *Bathymodiolus*

Le genre le plus étudié au sein des bathymodioles, et le sujet de notre travail, est le genre *Bathymodiolus*. Les moules *Bathymodiolus* possèdent un tube digestif toujours fonctionnel bien que réduit en taille. Elles peuvent filtrer et assimiler des particules organiques, des bactéries et du microplancton (Page *et al.*, 1991; Le Pennec *et al.*, 1995; Riou *et al.*, 2010a). Pile et Young 1999 ont montré que *B. childressi* du Golfe du Mexique filtre principalement de l'ultraplancton (taille  $<5\mu\text{m}$ ) dont des cyanobactéries, des bactéries et des protozoaires, et que la taille du plancton filtré augmentait avec la taille des moules. (Riou *et al.*, 2010a) ont observé des foraminifères et des frustules de diatomées dans l'estomac de *B. azoricus* du site de Menez Gwen et des silicoflagellés et des diatomées dans l'estomac de *B. azoricus* de Lucky Strike. Ces microalgues mesuraient entre 10-20 $\mu\text{m}$ . Comme la plupart des Bivalves, ces moules utilisent leurs branchies pour filtrer des particules qu'elles piègent dans le mucus branchial sécrété et qu'elles ingèrent ensuite, mais ce régime hétérotrophe est très limité surtout en grande profondeur en raison de la rareté de matière organique en suspension. Des expériences ont cependant montré que les juvéniles dépendent fortement de l'alimentation par filtration au début de leur vie alors que la nutrition symbiotique est prépondérante chez les adultes de grande taille (Martins *et al.*, 2008).

Chez les adultes, la nutrition est donc principalement assurée par des bactéries symbiotiques, que les moules abritent dans des cellules spécialisées de leur épithélium branchial nommées bactériocytes (figure 28) au sein de vacuoles. Il s'agit donc d'une symbiose le plus souvent intracellulaire (sauf chez quelques bathymodioles de petites tailles chez lesquelles les bactéries sont à la surface des cellules branchiales (Gros and Gaill, 2007)). Le nombre de bactéries endosymbiotiques est estimé à environ  $2.5 \times 10^{12}$  par individu (Duperron *et al.*, 2016), ce qui représente l'équivalent du nombre de bactéries présentes dans un mètre cube d'eau de mer.

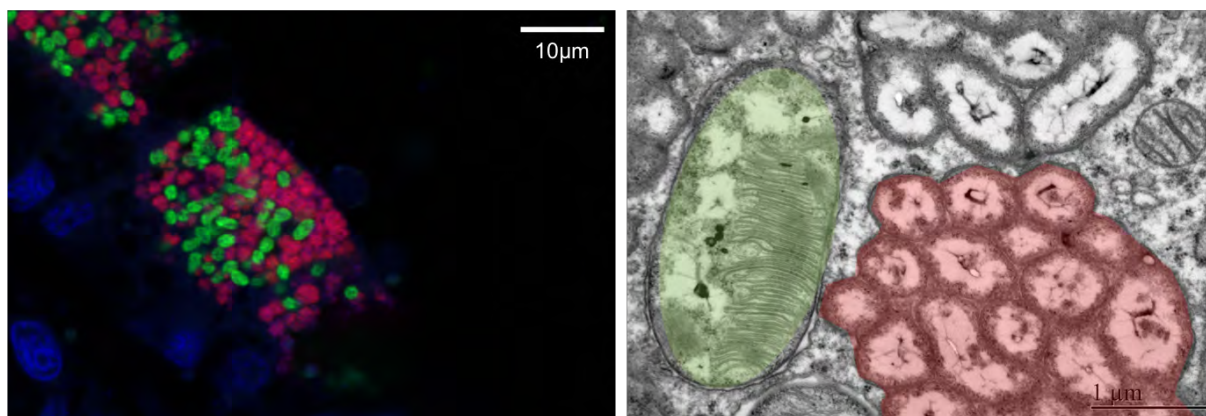


Figure 28 : A gauche : image prise en microscopie confocale avec un marquage FISH permettant de visualiser les endosymbiotes et un marquage DAPI permettant de visualiser l'ADN. En vert les bactéries méthanotrophes et en rouge les bactéries sulfo-oxydantes. A droite : image en microscopie électronique d'un bactériocyte de *Bathymodiolus azoricus* et les couleurs artificielles correspondant aux deux types de symbiotes.

L'incubation de moules vivantes ou de tissu branchial en présence de carbone inorganique radio-marqué (source de carbone) et de substrats réduits (source d'énergie) a démontré la production de carbone organique par des symbiotes bactériens et son transfert vers l'hôte animal. Des estimations pour *B. heckeræ* montrent que jusqu'à 60% du carbone organique issu de l'oxydation du méthane et 40% de celui issu de l'oxydation des sulfures sont transférés à l'hôte (Van Dover *et al.*, 2003). La façon dont le transfert de carbone est réalisé est encore débattue, mais il existe deux pistes majeures qui sont la digestion des symbiotes (« farming ») et/ou le relargage de composés par ceux-ci (« milking ») (Streams *et al.*, 1997; Kádár *et al.*, 2008). L'observation au MET a montré un grand nombre de corps lysosomaux dans les branchies des *Bathymodiolus spp.*, ainsi qu'une activité lysosomale plus importante dans les branchies en comparaison avec des branchies de bivalves non symbiotiques (Fiala-Medioni *et al.*, 1994; Salerno *et al.*, 2005; Kádár *et al.*, 2008). Le « milking » est plus difficile à démontrer, et la proportion de chacun des mécanismes demeure inconnue.

### 1.2.5 La mise en place de la symbiose chez les bathymodiales

La manière dont les bactéries sont acquises par l'animal et cantonnées dans le tissu branchial de l'hôte n'a pas été entièrement élucidée. Le principal mode d'acquisition des bactéries serait un transfert horizontal, c'est à dire par endocytose des bactéries directement présentes à l'état libre dans l'environnement, ou éventuellement relarguées par d'autres individus (Won *et al.*, 2003; Wentrup *et al.*, 2013), ce qui représente un transfert latéral. La colonisation se produit au cours des stades précoces de la vie. Chez de petits juvéniles (4-21mm) de *Bathymodiolus*



*azoricus*, des symbiotes ont été observés dans de nombreux tissus épithéliaux, mais pas d'autres types de bactéries non symbiotiques. Dans les étapes ultérieures du développement de la moule ne subsisteront que les bactéries localisées sur l'épithélium branchial. Donc le processus d'infection est très spécifique et sélectif, limité aux bactéries symbiotiques, et implique une évolution ontogénique dans la colonisation puisque, plus tard dans le développement de la moule, les symbiotes seront présents uniquement dans un seul type cellulaire des branchies : les bactériocytes (Wentrup *et al.*, 2013).

### 1.2.6 Identité, diversité et métabolisme des symbiotes

La présence de bactéries endosymbiotiques intracellulaires dans des bactériocytes a été confirmée chez toutes les *Bathymodiolus* étudiées. Chez les espèces sélectionnées pour notre étude *B. azoricus*, *B. puteoserpentis* et *B. aff. boomerang*, l'observation au MET des filaments de branchies et l'étude d'extraits d'enzymes en Western blot et en biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence la présence de 2 symbiotes différents appartenant tous deux au clade des *Gammaproteobacteria* : des bactéries méthanotrophes (MOX) et des bactéries sulfoxydantes (SOX) (figure 28). Les MOX sont de plus grande taille (1.25µm de diamètre), de forme coccoïde et leur cytoplasme abrite des membranes empilées. Ces bactéries utilisent le méthane comme source d'énergie et de carbone (Childress *et al.*, 1986; Cavanaugh *et al.*, 1987; Fisher *et al.*, 1987). Les SOX sont plus petites (0.35µm de diamètre), en forme de bâtonnet ou coccoïde, (selon le plan d'observation : longitudinal ou transversal). Elles utilisent le sulfure d'hydrogène comme source d'énergie et le CO<sub>2</sub> (ou l'ion bicarbonate) comme source de carbone (figure 29) (Fisher *et al.*, 1987; Arndt *et al.*, 2001). Certaines de ces bactéries SOX seraient également capables d'utiliser l'hydrogène comme source d'énergie alternative pour la fixation du carbone (oxydation du dihydrogène), notamment sur certains sites où celui-ci est très abondant (Petersen *et al.*, 2011). De nouvelles études du protéome et du génome de *B. azoricus* révèlent que certaines fonctions-clés du métabolisme seraient accomplies par l'hôte, comme par exemple la pré-concentration du CO<sub>2</sub> pour l'apport en carbone pour les SOX. Ceci suggère une interdépendance des acteurs de cette symbiose (Ponnudurai *et al.*, 2016).

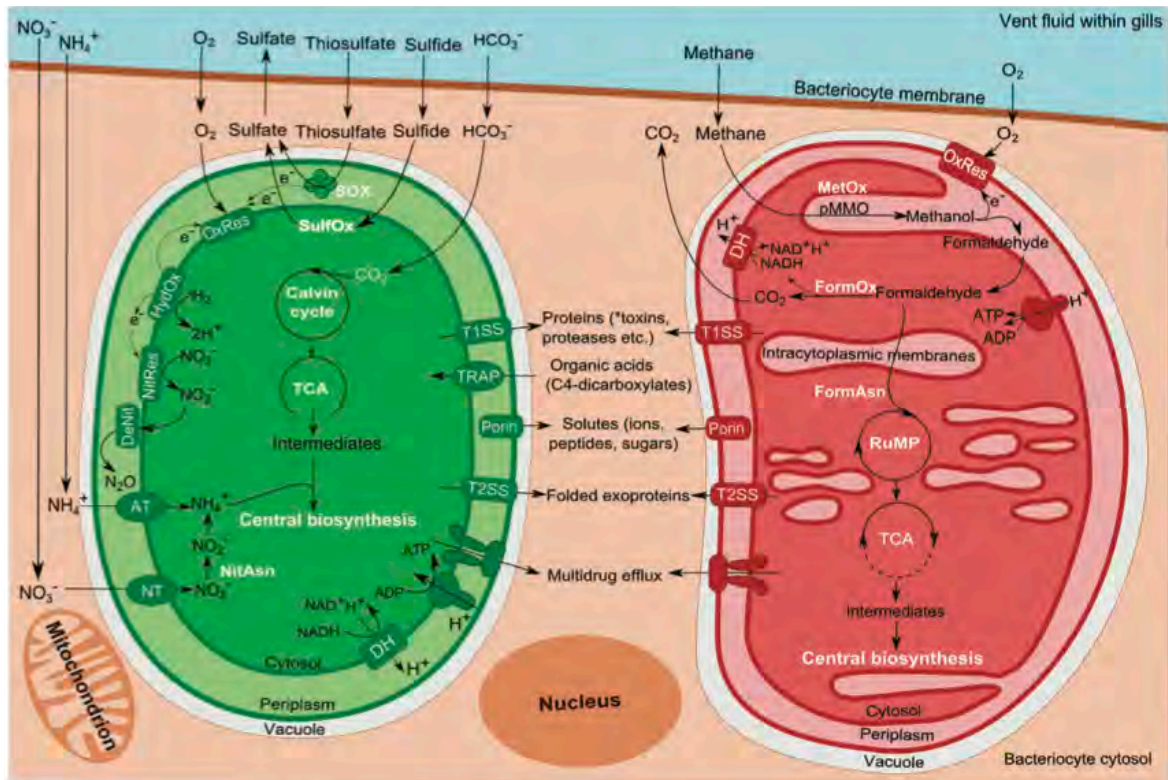


Figure 29 : Schéma d'un bactériocyte montrant les voies métaboliques principales des symbiotes chez *Bathymodiolus azoricus*. En vert le symbiote sulfo-oxydant et en rouge le symbiote méthanotrophe. AT : transporteur d'ammonium, DH : déhydrogénase, DeNit : dénitrification, FormAsn : assimilation du formaldéhyde FormOx: oxydation du formaldéhyde en formiate et CO<sub>2</sub>, HydOx : oxydation de l'hydrogène, MetOx : oxydation du méthane par pMMO (complexe enzymatique méthane-monooxygénase) en méthanol puis NitAsn : assimilation de l'azote, NitRes : respiration de nitrate, NT : transporteur de nitrate, OxRes : phosphorylation oxydative avec l'oxygène comme accepteur d'électrons terminaux, SOX : oxydation du thiosulfate, SulfoX : oxydation du sulfure par la voie rDSR-APS-Sat, TCA : cycle de l'acide tricarboxylique, TRAP : transporteur périplasmique indépendant de l'ATP, T1SS : système de sécrétion de type I, T2SS : système de sécrétion de type II (Ponnudurai *et al.*, 2016) .

Si la double symbiose (SOX + MOX cohabitant au sein des mêmes bactériocytes) est confirmée chez *B. azoricus*, *B. puteoserpentis* et *B. boomerang*, d'autres bathymodiales abritent un seul type de symbiote comme par exemple l'espèce *B. thermophilus* de la ride Est-Pacifique qui n'a que des bactéries SOX (Duperron *et al.*, 2009) ou *B. childressi* du Golfe du Mexique qui n'a que des MOX (Childress *et al.*, 1986). Les bactéries sulfo-oxydantes des différentes espèces hôtes sont proches entre elles phylogéniquement, de même que les bactéries méthanotrophes, ces deux types métaboliques étant plus éloignés entre eux. Les symbiotes, SOX comme MOX de *B. azoricus* et *B. puteoserpentis* sont d'ailleurs identiques du point de vue de leur séquence codante pour l'ARN ribosomique 16S, un marqueur de référence pour l'identification de bactéries (Duperron *et al.*, 2006).

Au delà de ces deux symbiotes majoritaires, d'autres types de symbiotes plus rares ont été mis en évidence plus récemment. Un autre symbiote a été décrit chez *B. azoricus*. Il s'agit d'une *Epsilonproteobacteria* filamenteuse qui se trouve à la surface de la branchie (ectosymbiote) et dont le rôle est actuellement encore mal connu (figure 30) (Assié *et al.*, 2016). Un autre type de symbiote mis en évidence et dont le rôle pourrait être pathogène puisqu'on le trouve associé à des noyaux en cours de dégradation, est constitué de bactéries vivant dans le noyau des cellules intercalaires (Zielinski *et al.*, 2009).

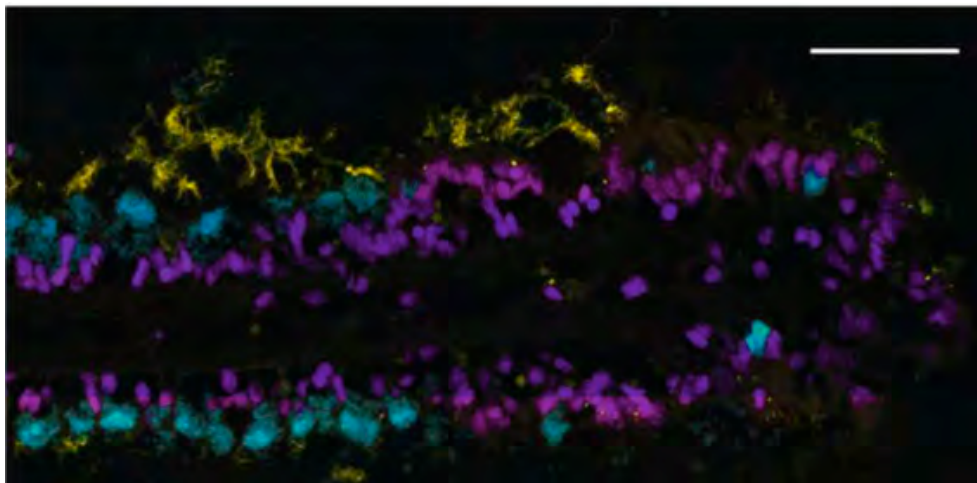


Figure 30 : Image prise au microscope confocal. Marquage FISH permettant de visualiser les ectosymbiotes *Epsilonproteobacteria* des bathymodiales sur une coupe transversale de branchie de *B. azoricus*. En jaune, les *Epsilonproteobacteria*, en cyan les endosymbiotes (SOX+MOX) et en violet l'ADN de l'hôte (barre d'échelle = 20µm) (Assié *et al.*, 2016).

### 1.2.7 Flexibilité de la symbiose ou des concentrations en symbiotes variant avec la disponibilité de leurs substrats

Dans le milieu naturel, des populations de moules vivant dans des environnements plus ou moins chargés en composés réduits semblent présenter un nombre de symbiotes de chaque type (SOX et MOX) corrélé aux concentrations de substrats disponibles, ce qui offre certainement une flexibilité bienvenue à ces moules capables d'utiliser le méthane comme les sulfures (Fiala-Medioni *et al.*, 2002; Szafranski *et al.*, 2015). La technique FISH 3D (3D fluorescence *in situ* Hybridization) et la PCR quantitative (qPCR) ont permis d'estimer l'abondance relative des deux types de symbiotes SOX et MOX présentes dans les branchies de plusieurs espèces de *Bathymodiolus*, et de démontrer que les proportions de ces symbiotes pouvaient effectivement varier en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'habitat au voisinage immédiat des moules (Halary *et al.*, 2008; Guezi *et al.*,

2014; Szafranski *et al.*, 2015). Une baisse progressive de la quantité de SOX a ainsi été observée chez des *B. azoricus* placés 30 jours dans un environnement privé de sulfure d'hydrogène. Après ce laps de temps, les moules ont été ré-acclimatées dans une eau de mer enrichie en sulfure d'hydrogène et une augmentation du nombre de symbiotes a été observée (Kádár *et al.*, 2005). Des expériences en aquarium pressurisé ont montré des variations importantes du volume occupé par les bactéries endosymbiotiques dans les branchies de *B. azoricus*. En présence de bicarbonate et/ou de sulfure, le volume de bactéries sulfoxydantes a augmenté en seulement 5h (Riou *et al.*, 2008; Colaco *et al.*, 2011; Szafranski *et al.*, 2015; Duperron *et al.*, 2016). D'autres expériences en aquarium dans un milieu contrôlé sur 6 mois montrent des variations des quantités de symbiotes (Colaco *et al.*, 2011). L'environnement influencerait donc fortement la densité de symbiotes, et cette flexibilité contribue sans doute à optimiser l'utilisation des ressources disponibles, participant au succès écologique des bathymodioles. Comme évoqué au paragraphe précédent, une telle flexibilité repose sur une forme de régulation des abondances de bactéries, sous tendue par des mécanismes impliqués chez l'hôte et chez les symbiotes. Une étude récente a ainsi confirmé l'influence de l'environnement sur l'expression du transcriptome de la moule. La plupart des gènes dont l'expression variait seraient impliqués dans la reconnaissance, le système immunitaire inné, le stress oxydatif et le métabolisme (Boutet *et al.*, 2011). En comparant ces niveaux d'expression avec une estimation de la charge en symbiotes, il a été montré que chez *B. thermophilus*, 7000 gènes régulent leur expression en relation avec le contenu en symbiotes, dont des gènes liés à l'apoptose (Guezi *et al.*, 2013), pointant l'intérêt de lier les deux approches.

Les caractéristiques physico-chimiques des habitats seraient la principale raison de la répartition de la faune des sources hydrothermales (figure 31). Mais il a été démontré que, sur de petites échelles spatiales et temporelles au sein de l'agrégation des moules, des variations physico-chimiques importantes ont lieu (Le Bris *et al.*, 2006). Les *Bathymodiulus* sont des animaux sédentaires, capables de se déplacer ponctuellement pour se rapprocher ou s'orienter vers les fluides, mais doivent néanmoins s'acclimater face à l'intensité variable des émissions de fluides réduits. Donc la variation des quantités de chaque type de symbiotes face aux variations de l'environnement pourrait constituer un atout et en partie expliquer leur abondance dans cet écosystème. Dès lors, il convient d'explorer les différents mécanismes évoqués vus dans la partie 1.1.5 et leur implication possible dans la régulation des densités de symbiotes chez les bathymodioles.

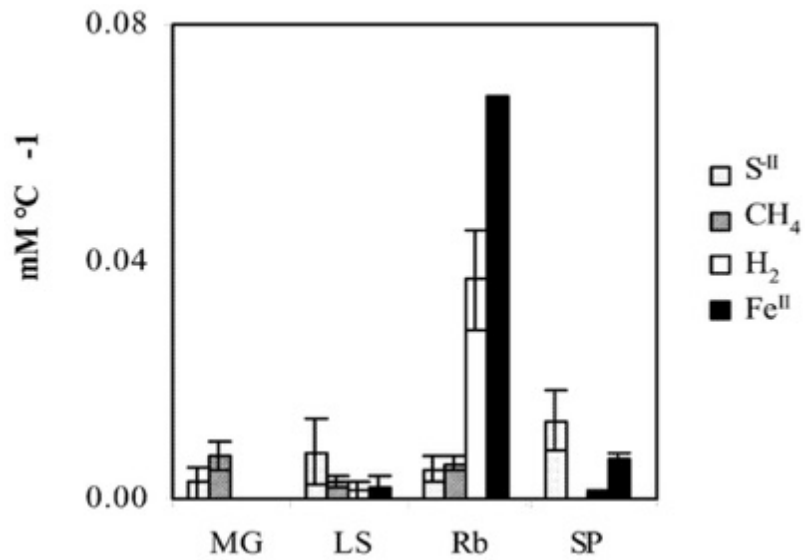


Figure 31 : Concentrations des donneurs d'électrons dans les fluides normalisées en fonction de la température de 4 sites de sources hydrothermales de la dorsale Médio-Atlantique (en mmol.Kg<sup>-1</sup>). Abréviations : MG, Menez Gwen; LS, Lucky Strike; Rb, Rainbow; SP, Snake Pit. Adapté d'après (Le Bris and Duperron, 2010).

## 2 OBJECTIFS ET APPROCHES METHODOLOGIQUES DE L'ETUDE

### 2.1 OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de ce travail de thèse est de mettre en évidence l'existence et d'apprécier le rôle de différents mécanismes potentiellement impliqués dans la régulation de l'abondance des symbiotes chez les bathymodioles, afin de comprendre comment cette régulation participe à l'adaptation des moules à leur milieu de vie (Tableau 5). Dans une approche comparative, nous avons choisi de travailler sur 3 espèces (*Bathymodiolus azoricus*, *B. puteoserpentis* et *B. aff. boomerang*). Chacune possède une double symbiose SOX et MOX. *B. azoricus* et *B. puteoserpentis* vivent près des sources hydrothermales et nous les comparerons avec *B. aff. boomerang* qui provient des suintements froids. *B. azoricus* et *B. puteoserpentis* vivent sur des sites plus ou moins profonds, nous permettant de comparer l'impact de la dépressurisation lors de la remontée des échantillons qui est plus ou moins forte selon la profondeur. Une espèce côtière dépourvue de symbiotes est utilisée comme contrôle (*Mytilus edulis*).

Tableau 5 : Tableau regroupant les différentes techniques utilisées pendant la thèse

Mécanismes	Méthode	Déjà utilisé sur ...
Multiplication cellulaire	Anticorps anti-phospho-histone H3	<i>Codakia orbicularis</i>
Multiplication cellulaire	Nucleotide synthétique BrdU	<i>Codakia orbicularis</i> et <i>Riftia pachyptila</i>
Multiplication cellulaire	Nucleotide synthétique EdU	aucun
Division bactérie	Anticorps anti-FtsZ	Un nématode marin
Division bactérie	MET	<i>Bathymodiolus azoricus</i>
Apoptose	TUNEL	<i>Codakia orbicularis</i> , <i>Euprymna scolopes</i> , <i>Riftia pachyptila</i> , et le charançon <i>Sitophilus granarius</i>
Apoptose	Anticorps anti-caspase 3 active	La lucine <i>Codakia orbicularis</i> et les coraux

Mécanismes	Méthode	Déjà utilisé sur ...
Relargage	Métabarcoding	Le microbiote intestinal humain
Relargage	qPCR	Le ver <i>Riftia pachyptila</i>
Relargage	FISH	Le ver <i>Riftia pachyptila</i> et la lucine <i>Codakia orbicularis</i>
Mise en place de la branchie aposymbiotique	MET	La lucine <i>Codakia orbicularis</i> et le ver <i>Riftia pachyptila</i>

Dans un premier volet de l'étude, nous nous sommes intéressés à la régulation des abondances bactériennes par la croissance en nombre des symbiotes. Contrairement à certains des modèles que nous avons présenté dans l'introduction, très peu de données sont disponibles concernant les bathymodioles et ce travail est donc pionnier. L'objectif de ce volet est de mettre en évidence les patrons de prolifération des cellules de la branchie ainsi que des bactéries symbiotiques dans différentes conditions physico-chimiques, afin de voir de quelle manière l'environnement influence l'augmentation des densités bactériennes, ainsi que la densité de cellules contenant les bactéries. Les résultats de ce travail sont présentés au chapitre 3.

Concernant le contrôle et la diminution du nombre de symbiotes, les résultats d'études précédentes fournissent davantage de pistes, notamment chez *B. azoricus*. L'implication de l'apoptose (mort cellulaire programmée) dans la régulation de la symbiose suggère un rôle important du système immunitaire. Des résultats en transcriptomique ont montré que, lorsque la charge symbiotique est forte dans les branchies de *B. thermophilus*, les gènes impliqués dans l'apoptose sont surexprimés, et *vice versa* (Guezi *et al.*, 2013). A partir de ces résultats, une hypothèse sur la régulation de la quantité de symbiote a été formulée. Elle propose une régulation directe de la quantité de symbiotes par l'apoptose des bactériocytes chargés en bactéries. En quelque sorte, les bactéries trop nombreuses deviendraient des ennemis pour le bactériocyte et l'organisme programmerait sa destruction. Dans les exemples décrits dans l'introduction, tels les coraux et le charançon, l'apoptose des cellules qui hébergent les symbiotes permet la perte rapide d'anciens alliés, devenus inutiles voire nuisibles pour l'hôte. Mais les résultats en transcriptomique réalisés sur un organe entier ne permettent pas d'affirmer que ce sont bien les bactériocytes qui rentrent en apoptose. Il

s'agit tout au plus d'une corrélation à l'échelle d'un organe. Il convient de visualiser le lien direct éventuel entre densité de symbiotes et apoptose. Un objectif de notre étude est donc de visualiser les patrons d'apoptose dans les tissus de bathymodiales afin de tester l'hypothèse d'un lien entre apoptose et forte densité de bactéries, et de mieux comprendre le rôle joué par l'apoptose dans la régulation des densités de bactéries et/ou dans la structuration et la dynamique de la branchie. Ce travail est décrit plus en détail dans la partie 4.1.

La diminution du nombre de symbiotes peut également passer par leur expulsion massive des tissus animaux, à l'image de ce qui se produit chez les coraux lors du blanchissement, ou chez la sépiole. Dans le cadre de la transmission horizontale des symbiotes avérée chez les bathymodiales, ce relargage présente également l'avantage de reconstituer un stock de bactéries dans l'environnement immédiat des moules, les rendant disponibles pour s'installer chez les post-larves de nouveaux individus par transmission latérale et il pourrait s'agir d'un mécanisme important dans le cycle de vie de l'holobionte. Un autre objectif de ce travail est de tester si un tel relargage existe chez les bathymodiales, et s'il est éventuellement favorisé par certaines conditions environnementales (par exemple une forte abondance d'un substrat réduit, ou une exposition à des températures à la limite de la tolérance des hôtes). Ce volet du travail fait l'objet de la partie 4.2.

Enfin lorsque les bathymodiales sont éloignées de leur milieu et n'ont plus accès aux substrats nécessaires aux symbiotes, l'hôte perd ses bactéries, à l'image de ce qui se produit lors de l'extinction d'une sortie de fluide. Un dernier objectif est de visualiser la dynamique de la perte de symbiotes dans la branchie, et son devenir. Des observations en microscopie électronique et la maintenance d'animaux en les nourrissant avec des microalgues ont permis d'observer les mécanismes intracellulaires mis en jeu dans le bactériocyte lors de ce changement de régime. Ces résultats sont présentés dans la partie 4.3.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse sont ensuite récapitulés, discutés et remis dans le contexte des connaissances relatives aux bathymodiales et à d'autres associations symbiotiques au chapitre 5, qui présente également les perspectives de ce travail.



## **2.2 APPROCHE METHODOLOGIQUES : DES EXPERIMENTATIONS *IN VIVO* EN AQUARIUMS PRESSURISES AUX EXPERIMENTATIONS A TERRE.**

Les travaux menés au cours de cette thèse s'appuient sur une approche expérimentale réalisée le plus souvent sur des bathymodioles vivantes, ce qui a nécessité l'utilisation d'approches originales compte tenu de la faible accessibilité et de la profondeur importante des sites étudiés. Pour récolter la faune des sources hydrothermales ou des fluides froids, plusieurs problèmes existent. Les principaux sont la profondeur à laquelle se situent les sites, et la pression. Pour descendre faire des prélèvements, des submersibles tels que le ROV Victor 6000 peuvent être employés. C'est un système modulaire commandé à distance. Il peut descendre jusqu'à 6000m de profondeur. Il est composé de deux parties : un véhicule (lumière, propulsion, navigation...) et un module scientifique, où est placé le matériel spécifique de la mission qui permet de collecter les spécimens *in situ* (Sarradin *et al.*, 2002). La pression qui règne dans les sites hydrothermaux est cependant largement supérieure à celle de la surface (1atm tous les 10m). Les animaux remontés à la surface subissent donc une décompression importante lors de la remontée, ce qui peut altérer leur état général et compromettre (ou entâcher d'artefacts) les résultats d'expériences menées ensuite en surface. Ce stress important peut même être léthal pour l'animal. Mais des animaux fraîchement récoltés peuvent être gardés en vie et dans un bon état physiologique en utilisant un aquarium pressurisé. Mon travail s'est ainsi appuyé sur une suite d'outils mis au point par l'équipe AMEX dirigée par Bruce Shillito à l'UPMC. IPOCAMP (Incubateur Pressurisé pour l'Observation et la Culture d'Animaux Marins Profonds) est un aquarium qui permet de simuler des conditions similaires de pression par rapport au lieu de récolte. Il a une contenance d'environ 19 litres et peut créer une enceinte pressurisée jusqu'à 30MPa (soit environ la pression qui règne à 3000m de profondeur) (figure 32). L'eau de mer circule à l'intérieur d'IPOCAMP à un débit de 20l/heure (Shillito *et al.*, 2001, 2014). La température de l'eau de mer peut être réglée dans un intervalle de 2 à 100°C pour des expérimentations d'écophysiologie. L'intérieur de l'aquarium peut être filmé pour observer le comportement des animaux (Ravaux *et al.*, 2013). Les animaux peuvent être ainsi maintenus en vie dans l'aquarium pendant plusieurs jours pour faire des expérimentations (Pradillon *et al.*, 2004). Reste que lors de la remontée, la faune subit une décompression violente pouvant compromettre certaines expérimentations *in vivo*. Un système d'échantillonnage a été créé pour permettre la remontée d'animaux vivants en maintenant des conditions de pressions et températures similaires au site de prélèvement. Le système PERISCOP (Projet d'Enceinte de Remontée Isobare Servant la Capture d'Organismes Profonds) est composé d'une cellule

d'échantillonnage et un PRD (Pressurized Recovery Device). Les animaux sont collectés dans la cellule et le PRD permet de garder la pression du fond. Le PRD est fixé à un dispositif de navette et peut être remonté à la surface. Le PRD est conçu pour permettre un transfert isobare vers d'autres dispositifs comme BALIST (Biology of *Alvinella* : Isobaric Sampling and Transfer), un aquarium pressurisé (Shillito *et al.*, 2008, 2014). A l'aide de cet équipement, il est maintenant possible de remonter des *Bathymodiolus* à leur pression native et de les transférer dans des enceintes permettant de réaliser des expérimentations dans les conditions le plus proche possible de celles régnant dans leur habitat natif.

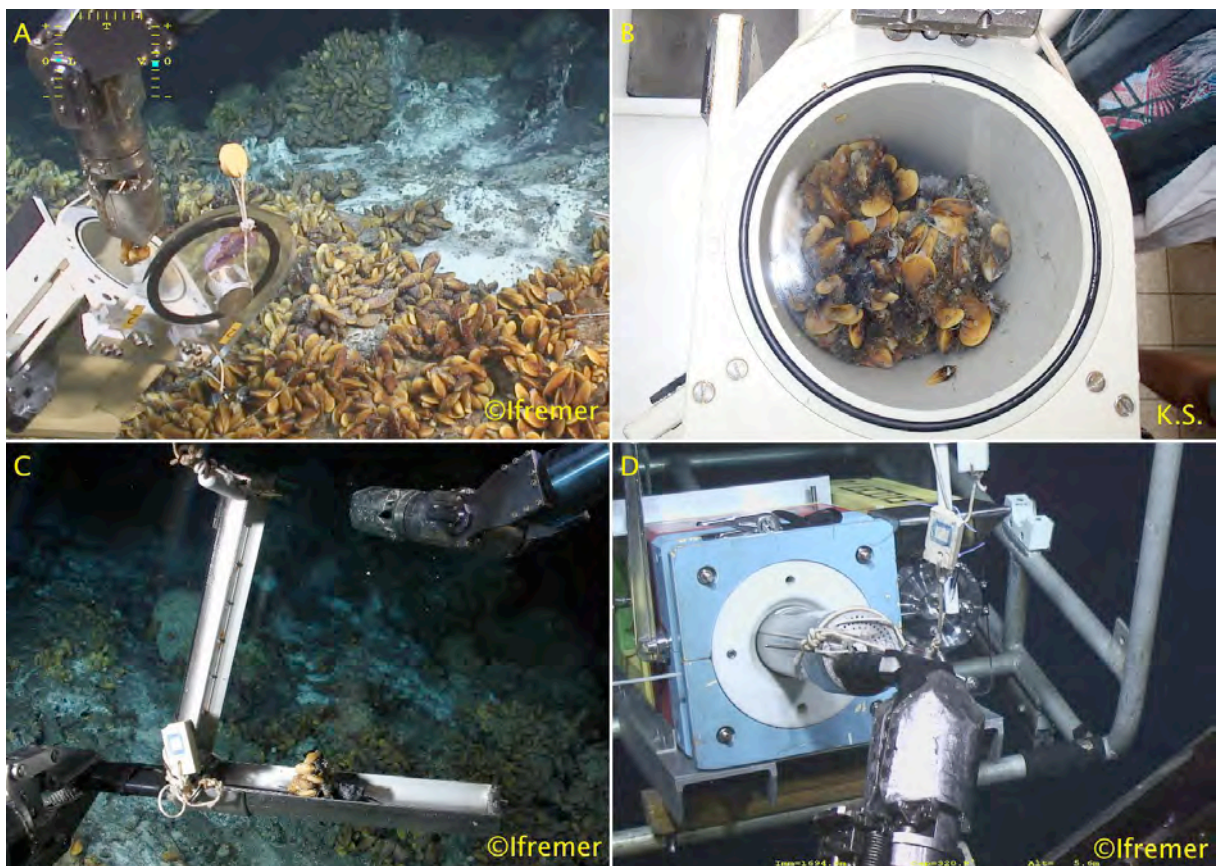


Figure 32 : Photos des deux types de remontées des échantillons A et B échantillonnage et remontée non isobare dans des boîtes fermées, C et D remontée isobare. A) Le ROV Victor 6000 dépose les moules dans la boîte. B) La boîte est remontée à la surface C) Le ROV Victor 6000 dépose des *B. azoricus* dans CROCO. D) Le ROV Victor 6000 insère CROCO dans PERISCOP qui maintiendra pression et température lors de la remontée. Photo A, C et D : ©Ifremer et B : Kamil Szafranski.

Dans la partie suivante seront décrits en détail tous les échantillonnages qui ont servi pour cette thèse. La figure 33 donne une vision synthétique des différentes expérimentations réalisées sur chacune des 5 campagnes à partir desquelles le travail a été mené, et des analyses qui ont été menées à partir de ces différentes expérimentations.

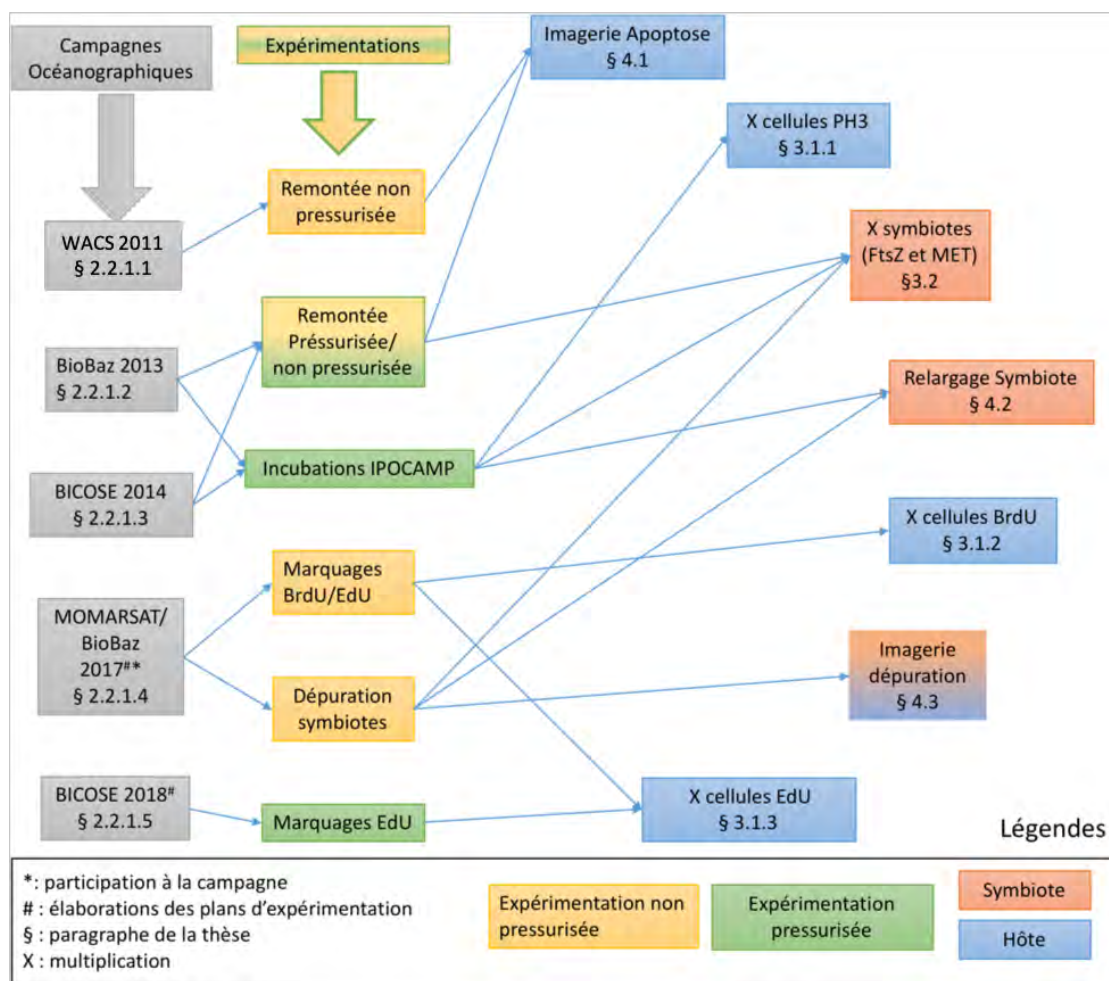


Figure 33 : Plan de la thèse. Schéma regroupant les différentes campagnes pendant lesquelles les bathymodiales ont été échantillonnées et plan des différents chapitres de la thèse. Les numéros correspondent aux chapitres où sont présentés les résultats des analyses correspondantes. WACS : West Africa cold seeps ; BioBaz : Biologie Intégrée de *Bathymodiolus azoricus* ; BICOSE : Biodiversité, Interactions, COnnectivité et Symbiose en milieux Extrêmes ; MOMARSAT : Monitoring the Mid-Atlantic Ridge ; PH3 : Phospho-Histone H3, marqueur de la mitose ; FtsZ : Filamentous temperature sensitive mutant Z, marqueur de la division des bactéries ; BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine, nucléotide synthétique ; EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine, nucleotide synthétique.

## 2.2.1 Expériences lors de Campagnes Océanographiques

### 2.2.1.1 Expérimentation sur des *Bathymodiolus aff. boomerang* des suintements froids lors de la campagne WACS 2011

Lors de la campagne WACS en 2011 (Olu, 2011), des *B.aff. boomerang* des suintements froids ont été prélevées au sein d'une population du site REGAB (5°47.903 S, 9°42.671E, à -3153m de profondeur). Ces moules sont utilisées dans la partie 4.1 pour comparer la localisation de

l'apoptose dans les branchies de bathymodiolus possédant deux types de symbiotes mais dans des écosystèmes différents, *i.e.* sources hydrothermales et suintements froids.

### **2.2.1.2 Expérimentation sur des *Bathymodiolus azoricus* des sources hydrothermales lors de campagne BioBaz 2013**

Des *Bathymodiolus azoricus* ont été récoltées lors de la campagne BioBaz 2013 (Lallier, 2013) sur deux sites de la ride Médio Atlantique : Menez Gwen (marqueur MG2 : 37°50.669N; 31°31.156W, à 830m de profondeur) et Rainbow (marqueur France 5 : 37°17.349N; 32°16.536W, à 2270m de profondeur) (figure 34).

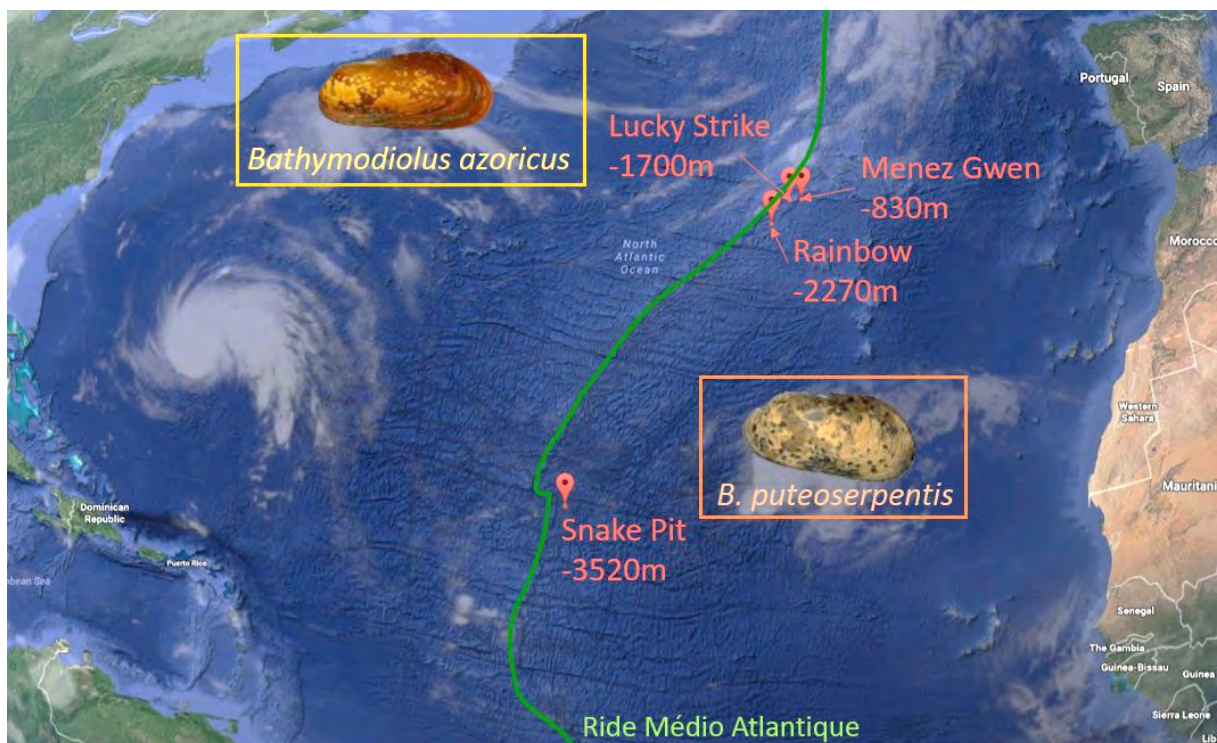


Figure 34 : Carte des sites hydrothermaux de la ride Médio-Atlantique échantillonnés dans le cadre de la thèse. Carte réalisée sur Google Map.

Des moules ont été remontées de manière dite non isobare ou isobare. Pour la remontée non isobare, les moules ont été collectées à l'aide du ROV Victor 6000 et placées dans une boîte étanche, mais pendant la remontée les spécimens subissent une décompression (1atm pour 10m) et une variation de température d'environ 15°C (figure 32A, B). Pour la remontée isobare, le ROV collecte des moules qui sont déposées dans CROCO, un dispositif de collecte couplé à PERISCOP (Shillito 2014). Une fois fermé, CROCO est inséré dans le dispositif nommé PERISCOP (Projet d'Enceinte de Remontée Isobare Servant la Capture d'Organismes

Profonds), qui permet de contrôler la pression et de garder ainsi les animaux aux conditions de pression proches du fond (figure 32, C, D). Les échantillons peuvent ensuite être envoyés vers la surface grâce à un système de navette, et arrivent à bord à la pression et la température proche du fond. Les moules remontées de manière pressurisée et non pressurisée ont été utilisées afin de comparer la localisation et la quantité de cellules apoptotiques dans les branchies dans la partie 4.1.

A la suite des remontées pressurisées, des moules remontées dans PERISCOP (remontée isobare) ont été sorties de l'enceinte et placées immédiatement dans des bouteilles 'Nalgene' de 1L qui ont ensuite été placées dans l'aquarium pressurisé IPOCAMP (Shillito *et al.*, 2014) et re-pressurisées à la pression du fond. Le but étant que les animaux restent à la pression du fond pendant toute l'expérimentation. Les moules placées dans les bouteilles ont passé ensuite 5 heures dans IPOCAMP. Une des bouteilles contenait du  $\text{NaHCO}_3$  (11.8mM) et du  $\text{Na}_2\text{S}$  36.4 $\mu\text{M}$  mélangés à de l'eau de mer filtrée (EDMF) sur une maille de 0.22 $\mu\text{m}$  (suppression des bactéries), constituant respectivement une source de carbone et d'énergie pour les bactéries symbiotiques SOX. Pour la seconde, seul du  $\text{NaHCO}_3$  (11.8mM, source de carbone) a été ajouté à l'eau de mer. Pour la troisième, seule de l'EDMF a été placée dans la bouteille avec les moules, constituant le témoin de l'expérience. A la suite de ces incubations de 5 heures, les spécimens ont été sortis des bouteilles et l'eau a été récupérée et filtrée sur maille 0.22 $\mu\text{m}$  pour analyser la diversité bactérienne présente. Les résultats de cette expérimentation sont décrits dans la partie 4.2.1. Les moules de l'expérimentation dans IPOCAMP ont déjà fait l'objet d'un article (Stage Master 2 Bérénice Piquet, voir en annexe 7.3) et un changement dans le ratio sulfo-oxydants/méthanotrophes a été observé. La quantité de bactéries sulfo-oxydantes a doublé dans les branchies des moules exposées aux sulfures (Szafranski *et al.*, 2015).

Les moules provenant des manipulations en aquarium pressurisé ont également servi à l'étude de la multiplication des cellules animales et des bactéries dans les branchies dans les parties 3.1.1 et 3.2.2.

### **2.2.1.3 Expérimentation sur des *Bathymodiolus puteoserpentis* des sources hydrothermales lors de campagne BICOSE 2014**

Lors de la campagne BICOSE 2014 (CAMBON-BONAVITA Marie-Anne, 2014), les moules *B. puteoserpentis* du site Snake Pit (marqueur Elan, 23° 22' 54" N, 44° 55' 48" W, à 3520m de profondeur) (figure 34) ont été remontées isobariquement ou non isobariquement, et ont servi à la partie 4.1.1 sur l'apoptose. Puis, comme dans la partie précédente, des moules ont été

placées dans des bouteilles Nalgène en présence de bicarbonate et de sulfures aux mêmes concentrations en suivant la même procédure, mais une bouteille supplémentaire a été réalisée qui contenait du méthane à saturation. Ces résultats sont présentés dans la partie 4.2.1 sur le relargage des symbiotes. Ces moules de l'expérimentation dans IPOCAMP ont déjà fait l'objet d'un article et un changement dans le ratio sulfo-oxydants/méthanotrophes a été observé. La quantité de bactéries sulfo-oxydantes a augmenté dans les branchies des moules exposées aux sulfures et au méthane (Duperron *et al.*, 2016).

#### **2.2.1.4 Expérimentation sur des *Bathymodiolus azoricus* des sources hydrothermales lors de campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 et à terre à l'aquarium de Roscoff**

Lors de cette thèse, j'ai eu la chance de pouvoir partir lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 et donc de pouvoir réaliser des manipulations auxquelles j'ai participé, depuis la prospection et l'élaboration du protocole, la mise en place du matériel, jusqu'à en assurer entièrement l'expérimentation à bord.

Des *Bathymodiolus azoricus* ont été récoltées lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 (Sarradin and Cannat, 2017) sur deux sites de la ride Médio Atlantique : Menez Gwen (marqueur MG2 : 37°50.669N; 31°31.156W, à 830m de profondeur) et Lucky Strike (marqueur Tour Eiffel : 37°17.333N; 32°16.541W, à 1690m de profondeur (figure 34).

Des moules de Menez Gwen et de Lucky Strike ont été maintenues dans de EDMF à 0.22µm, pendant plusieurs jours afin de suivre la progression de leur perte de leurs symbiotes et tester leur relargage éventuel. L'eau de ces aquariums a été filtrée à différent temps.

Des bathymodioles ont été placées dans de l'EDMF à 0.22µm dans différentes conditions (EDMF et NaHCO<sub>3</sub> (11.8µM) + Na<sub>2</sub>S (36.4µM)). D'autres ont subi des stress thermiques (passage de 5°C à 25°C). Les temps de manipulations ont été allongés passant de 5h à 48h et pour le stress thermique de 1h à 5h par rapport aux autres campagnes afin de comparer les résultats avec des temps plus longs. Il n'y a pas eu de remontée isobare ni d'expérimentation en conditions pressurisées (pas de PERISCOP ni d'aquarium pressurisé à bord), mais les manipulations ont été effectuées sur des moules provenant de sites moins profonds afin de limiter autant que possible l'effet des remontées (Menez Gwen -800m et Lucky Strike -1700m). L'analyse de l'ensemble des filtres issus de cette expérience font l'objet de la partie 4.2.2 sur le relargage des symbiotes.

Lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017, des balnéations ont en outre pu être réalisées avec différentes concentrations de Brdu et d'EdU (3.30 et 100mg/L) pendant 2h, 6h, 18h et 48h

sur des animaux entiers, ainsi que des branchies séparées de l'animal afin de mettre en évidence la prolifération cellulaire. Les balnéations ont pu aussi être réalisées sur des animaux venant juste d'être remontés et sur d'autres ayant commencé à perdre leurs symbiotes (de quelques jours à 1 mois et demi). Les résultats sur la multiplication cellulaire des bactériocytes sont exposés dans la partie 3.1

#### **2.2.1.5 Expérimentation sur des *Bathymodiolus puteoserpentis* des sources hydrothermales lors de campagne BICOSE 2018**

Suite à des tests concluants avec le marqueur de multiplication cellulaire EdU (voir partie 3.1.2), une deuxième expérimentation a été lancée sur des *Bathymodiolus puteoserpentis* qui ont été prélevées lors de la campagne BICOSE 2 (Cambon-Bonavita, 2018) sur le site de Snake Pit à 3500m de profondeur (figure 34). Les moules ont été remontées dans le dispositif PERISCOP permettant de les maintenir dans des conditions de pression et de température proches de leur environnement naturel. Les moules ont été ensuite transférées dans l'aquarium pressurisé IPOCAMP, en présence soit de 3mg.l<sup>-1</sup> d'EdU, soit en présence à la fois de 3mg.l<sup>-1</sup> d'EdU et des sulfures (Na<sub>2</sub>S 36.4μM) et avec une source de carbone (NaHCO<sub>3</sub> 11.8μM) pour nourrir les symbiotes SOX. Des premiers résultats de cette dernière campagne sont décrits dans la partie 3.1.3 sur la multiplication cellulaire chez l'hôte.

#### **2.2.2 Expériences et maintenance de *Bathymodiolus azoricus* et *Mytilus edulis* à Roscoff**

Mille moules du site Menez Gwen de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 ont pu être ramenées vivantes en avion à Brest et maintenues à l'aquarium d'Océanopolis sans ajout de nourriture dans de l'eau de mer filtrée, durant 1 mois et demi, pour permettre une dépuraison importante, sans atteindre à leur survie. Au bout de ce temps, elles ont été nourries avec des microalgues *T-Isochrysis*, une fois transférées à Roscoff au RAS (Roscoff Aquarium Service). Des balnéations avec du BrdU dans les mêmes conditions que précédemment ont été réalisées sur des animaux nourris avec ces microalgues. Des moules côtières *Mytilus edulis* ont été collectées dans le port en eau profonde du Bloscon à Roscoff (Finistère nord). Immédiatement après avoir été pêchées, les mollusques ont été maintenus 1 mois dans les mêmes conditions que les bathymodioles, *i.e.* à 8°C et nourris avec des *T-Isochrysis*.

## 2.3 PREPARATION DES TISSUS POUR LA MICROSCOPIE

### 2.3.1 Fixation, inclusion et préparation des échantillons pour la microscopie à fluorescence

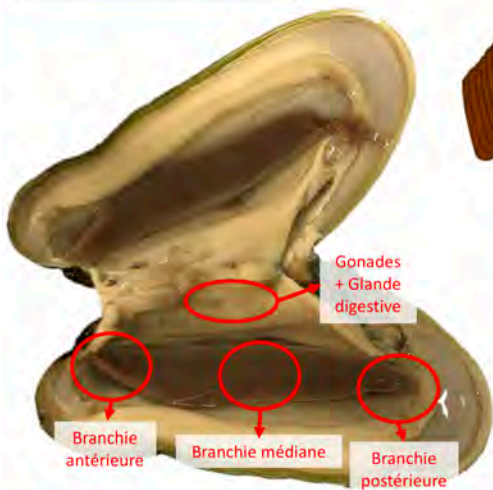
Un même protocole a été suivi pour tous les échantillons utilisés lors de la thèse pour la microscopie à fluorescence (figure 35). Dès leur remontée à bord du navire ou après les expériences menées dans IPOCAMP, les moules ont été disséqués en chambre froide à 4°C. Les parties antérieures des branchies ont été fixées séparément au formaldéhyde 3.7% dans de l'EDMF, durant 4h à 4°C. Les branchies ont ensuite été rincées à l'EDMF puis déshydratées dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante (50, 70, 80, 95%), chaque bain a duré 15min. Les échantillons ont été rapatriés au laboratoire dans l'éthanol à 100% et conservés à 4°C jusqu'à l'inclusion.

Les branchies ont été incluses dans la résine de Steedman composée d'un mélange (p/p) de 90% de PEG (Poly éthylène glycol distearate) et de 10% d'hexadécanol, préchauffé pendant 3h à 46°C. Les échantillons ont été ensuite plongés successivement dans une série de cinq bains à 37°C pendant 30min chacun. Un gradient croissant de résine ( $1/3$  résine et  $2/3$  éthanol 100%,  $1/2$  résine et  $1/2$  éthanol 100%,  $2/3$  résine et  $1/3$  éthanol 100%) composait les 3 premiers bains. Finalement, les échantillons ont été incubés dans deux bains de résine pure. Les échantillons inclus dans la résine ont été ensuite coulés dans des moules et laissés à température ambiante pour durcir. Les blocs ont été ensuite coupés en sections de 8µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (Thermo, Royaume-Uni) et les coupes ont été déposées sur des lames SuperFrost Plus (fournisseur VWR). Les coupes sont le plus souvent réalisées dans le sens transversal des filaments branchiaux (figure 28), mais quelquefois aussi dans le sens longitudinal, ce qui est alors précisé.

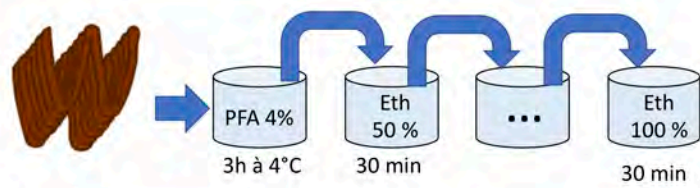
Les lames ainsi obtenues ont été dérésinées en immergeant les lames dans 2 bains l'éthanol 100% successifs, pendant 10 minutes chacun, à température ambiante. Les tissus ont été progressivement réhydratés dans des bains d'éthanol décroissant (95%, 90%, 80%, 70%) pendant 3 minutes pour chaque bain, à température ambiante.



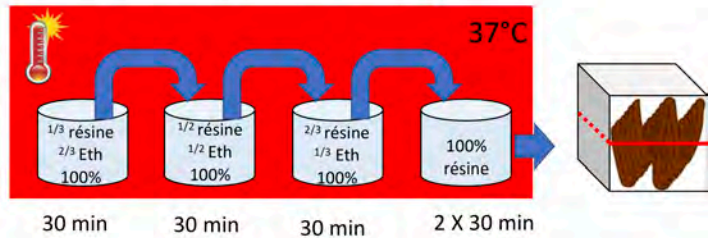
1°) Dissection des Moules



2°) Fixation et déshydratation des tissus



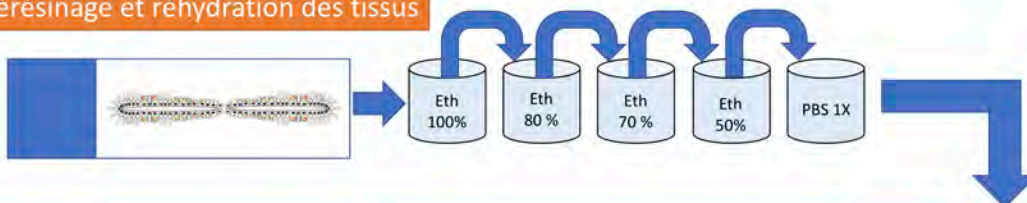
3°) Imprégnation et inclusion du tissu



4°) Coupes au microtome



5°) Dérésinage et réhydratation des tissus



6°) Perméabilisation des Tissus

Caspase 3 active	FtsZ	TUNEL	BrdU
Phospho-histone H3			
EdU			
PBS 1X + Triton + BSA 60 min	Lysozyme 0,1% 20 min à 37°C ↓ PBS 1X + Triton + BSA 60 min	Proteinase K Tampon (Tris HCl) 8 min à 37°C	PBS 1X + Triton + BSA 60 min ↓ HCl 0,1M sur glace 10 min ↓ HCl 2M à 37°C 60 min ↓ PBS 1X + Triton + BSA 60 min

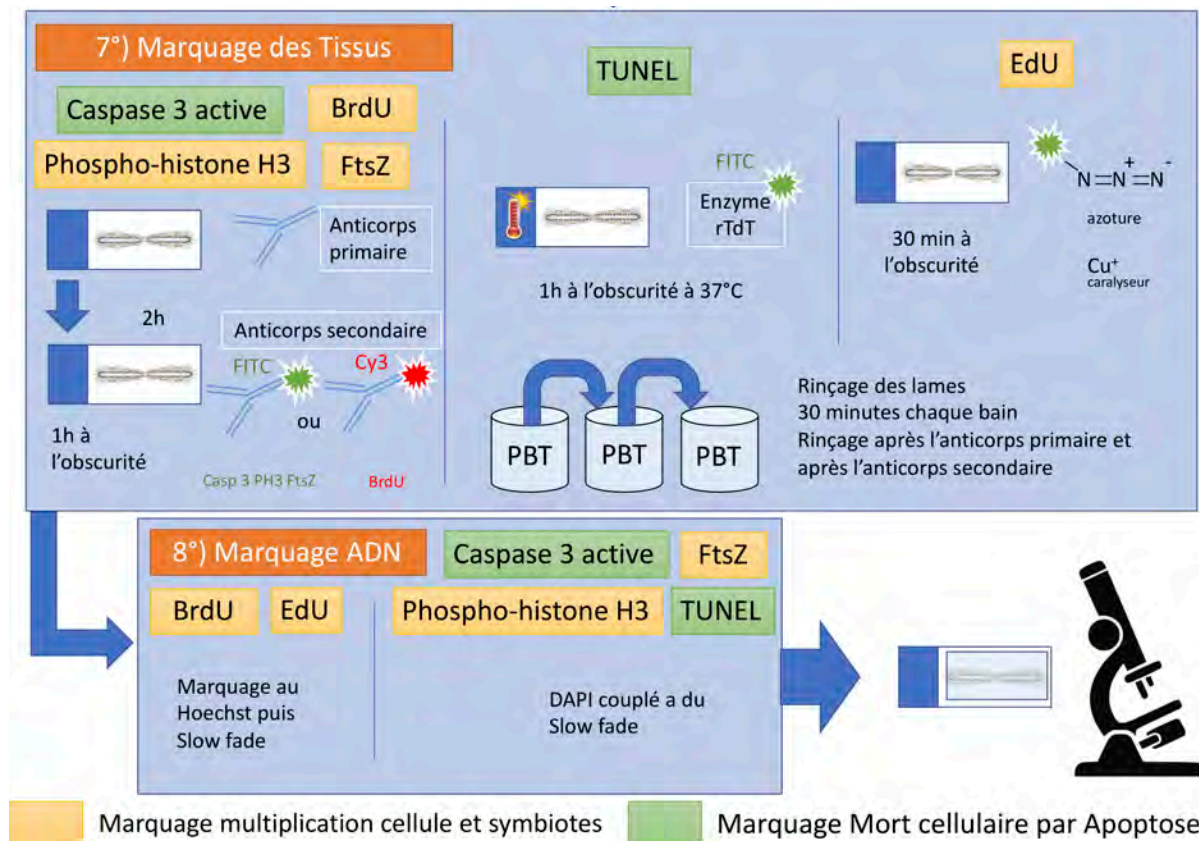


Figure 35 : Schéma représentant les différentes étapes de dissections, d'inclusions, de coupe et de marquage des branchies lors de la thèse. Les étapes indiquées par un thermomètre rouge sur les lames indiquent une incubation à chaud en étuve (37°C) et un thermomètre bleu une incubation sur glace.

### 2.3.2 Fixation, inclusion et préparation des échantillons pour la microscopie à électronique à transmission (MET)

Pour la MET, quelques filaments de la branchie médiane ont été prélevés lors de la dissection des moules. Les filaments branchiaux ont été fixés dans du glutaraldéhyde à 4% dans un tampon cacodylate 0.2M pH 7.4, complété avec du NaCl pour une iso-osmolarité finale avec l'eau de mer. La fixation a été effectuée une nuit à 4°C. Le fixateur a été rincé 2 fois dans le tampon cacodylate pH 7.4 dans de l'eau de mer diluée, additionnée de sodium azide pour la conservation. De retour au laboratoire, les échantillons ont été rincés au tampon cacodylate et post-fixés à l'osmium 1% dans le tampon cacodylate pendant 1h. Après deux rinçages au tampon cacodylate, les échantillons ont été deshydratés dans des bains progressifs d'éthanol : 3x20min de chacun, à partir des concentrations 50%-70%-95%,100% d'éthanol.

L'imprégnation a été faite dans des mélanges successifs d'éthanol 100% et de résine Spürr en proportions respectives : 1/3, 1/2 et 3/1, durant 1 heure chacun, puis durant une nuit pour le dernier. Ensuite, trois bains de résine Spürr pure d'une demi-journée pour les deux premiers,

suivis d'une nuit pour le dernier bain ont été effectués. Enfin, l'inclusion a été faite dans des moules de silicone et la polymérisation a eu lieu en étuve à 60°C durant deux jours.

Les blocs ont été coupées à l'ultra microtome (LEICA Ultracut UCT Microtome). L'épaisseur est de 1µm pour les coupes semi-fines qui ont été colorées au bleu de toluidine et à 60 nm pour les fines qui ont été contrastées aux sels de métaux lourds : 2.5% d'acétate d'uranyle et 0.2% de citrate de plomb selon les méthodes classiques de coloration pour l'électronique. Les coupes ont été observées au MET (JEOL 1400 du service Merimage de Roscoff).

### 3 COMMENT AUGMENTER LA QUANTITE DE SYMBIOTES ?

---

#### 3.1 MULTIPLICATION DES CELLULES BRANCHIALES DE L'HÔTE

Comme nous l'avons vu dans les exemples de symbioses développés dans l'introduction, divers mécanismes cellulaires permettent l'augmentation de la quantité de bactéries. Chez les bathymodioles du genre *Bathymodiolus*, dont les symbiotes sont inclus dans des cellules épithéliales branchiales spécialisées, la multiplication des bactériocytes de l'hôte pourrait lui permettre d'augmenter le nombre de ses symbiotes. En effet, si les bactéries sont présentes dans l'environnement, les nouveaux bactériocytes pourraient les endocyter afin d'accroître la quantité globale de symbiotes. La multiplication des symbiotes à l'intérieur des cellules pourrait également permettre d'augmenter le nombre de bactéries présentes chez un hôte. Dans le cadre de cette thèse, ces deux mécanismes ont été examinés : la multiplication des cellules de l'hôte d'une part, et la division des bactéries, d'autre part. La multiplication des cellules de l'hôte a été suivie par trois approches : (1) le marquage par immunohistochimie de la phospho-histone H3, un marqueur de la mitose ; (2) l'incorporation d'un nucléotide synthétique marqué (BrdU/EdU) lors de la réplication de l'ADN ; et (3) l'examen ultrastructural en MET. La multiplication des bactéries symbiotiques dans les tissus animaux a, quant à elle été examinée par deux approches : (1) le marquage par immunohistochimie d'une protéine marqueur de la division bactérienne : FtsZ, qui permet de suivre la division des symbiotes, et lors de (2) l'examen ultrastructural en MET. Nous décrivons ci-dessous les résultats obtenus.

##### 3.1.1 Mise en évidence des bactériocytes en cours de mitose par immunolocalisation de la phospho-histone H3, un marqueur de la mitose chez les eucaryotes

La phosphorylation de l'histone H3 joue un rôle important dans la condensation des chromosomes et la remodelisation de la chromatine lors de la multiplication cellulaire (partie 1.1.5.1.2). L'anticorps anti-phospho histone H3 est un immunomarqueur de la mitose couramment utilisé chez les mammifères (Hendzel *et al.*, 1997; Hans and Dimitrov, 2001; Li *et al.*, 2005). Nous avons utilisé ce marqueur de mitose, qui est présent en grande quantité lors de la métaphase afin de localiser les zones de multiplication des cellules de l'hôte dans les branchies. Ce même anticorps a déjà été testé avec succès chez *Codakia orbiculata* (Elisabeth *et al.*, 2012).

Cette approche nous permettra d'obtenir un instantané des cellules en cours de mitose dans un tissu.

## **Matériels et Méthodes**

### **Echantillons**

Pour étudier la multiplication des cellules, des spécimens de *Bathymodiolus azoricus* ont été récoltées lors de la campagne BioBaz 2013 sur deux sites de la ride Médio Atlantique : Menez Gwen à 830m de profondeur et Rainbow à 2270m de profondeur. Les moules ont été remontées grâce à PERISCOP, un dispositif permettant de garder les moules à une pression et une température proche du fond.

Une partie des moules ont été transférées immédiatement après la récupération dans IPOCAMP en présence de substrats pour les bactéries symbiotiques. Pour plus de détails voir partie 2.2.1.2 sur l'échantillonnage.

### **Marquage de la phospho-histone H3**

Pour préparer les marquages de la phospho-histone H3, nous avons suivi la procédure de préparation histologique des marquages, décrite dans la partie 2.3.1.

L'expérience de marquage à l'histone H3 a commencé sur les coupes réhydratées en les plongeant dans deux bains de PBS 1X pendant 3 minutes chacun. Les lames ont ensuite été incubées dans une solution de PBS à 0.1M contenant 2% de BSA et 0.3% de Triton X-100 pendant 2h à température ambiante dans une chambre humide, afin de perméabiliser les tissus et saturer les sites non spécifiques. Dans cette même solution, l'anticorps primaire anti-phospho-histone H3 (polyclonal Ser 10, Merck, Allemagne) a été dilué (5µg/ml) et déposé sur le tissu. Les lames ont été incubées 2h à température ambiante dans des chambres humides ou une nuit à 4°C. Des contrôles négatifs ont été effectués en omettant l'anticorps primaire. Les lames ont été ensuite rincées dans du PBT dans 3 bains de 10min. De la même manière, l'anticorps secondaire (Sigma-Aldrich, USA) couplé au fluochrome Alexa fluor 488 ® (Invitrogen, USA) a été dilué (1/200) dans la même solution et incubé dans une chambre humide noire pendant 1h. Les lames ont été ensuite rincées dans du PBT dans 3 bains de 10min. Pour finir, du « Slow fade », un photoprotecteur qui préserve le signal en fluorescence, couplé à du DAPI (Life Technologies) qui marque l'ADN des noyaux, a été déposé sur les tissus, ainsi qu'une lamelle de verre et du vernis à ongles afin de sceller la lamelle sur la lame. Pour une comparaison avec un Mytilidae non symbiotique, des tests de marquage de la phospho-histone

H3 ont été réalisés chez 4 individus de la moule *Mytilus edulis* (mêmes individus que la partie 4.1.1) en suivant le même protocole.

### **Observation et comptage des noyaux en mitose**

Les lames ont été ensuite observées au microscope confocal SP5 (Leica, Allemagne) aux longueurs d'ondes 505 à 555nm pour la phospho-histone H3 et à 400nm pour le DAPI. Les images ont été ensuite traitées et les comptages effectués à l'aide du logiciel Image J (Abràmoff *et al.*, 2004).

### **Résultats**

Le signal de marquage optimal de la phospho-histone H3 est obtenu lorsque l'anticorps primaire est incubé durant 2h. Dix individus de *Bathymodiolus azoricus* ont été testés avec 2 à 3 lames par individu, mais seulement 8 individus ont donné un marquage (Tableau 6). Les 3 autres individus n'ont pas donné de signal, probablement en raison de l'absence de mitose dans ces lamelles branchiales au moment de la fixation. Le marquage obtenu sur les individus est cependant similaire dans les deux sites ainsi que la quantité de cellules en division par lames quelles que soient les conditions de remontée : pressurisée ou non pressurisée. Sur une coupe donnée de filaments de bathymodiole coupés transversalement, seulement un à deux des noyaux sont marqués par l'anticorps anti phospho-histone H3, une quantité très faible. Par contre le marquage est net et non ambigu. Sur les images comportant deux noyaux allumés, ces noyaux sont très proches suggérant que ce sont les noyaux de deux cellules filles, indiquant la fin d'une mitose plutôt que deux cellules distinctes entrant en mitose (figure 36B et D). Sur une image, un hemocyte est marqué (figure 36A), mais la majorité des noyaux marqués sont localisés dans la zone des bactériocytes.

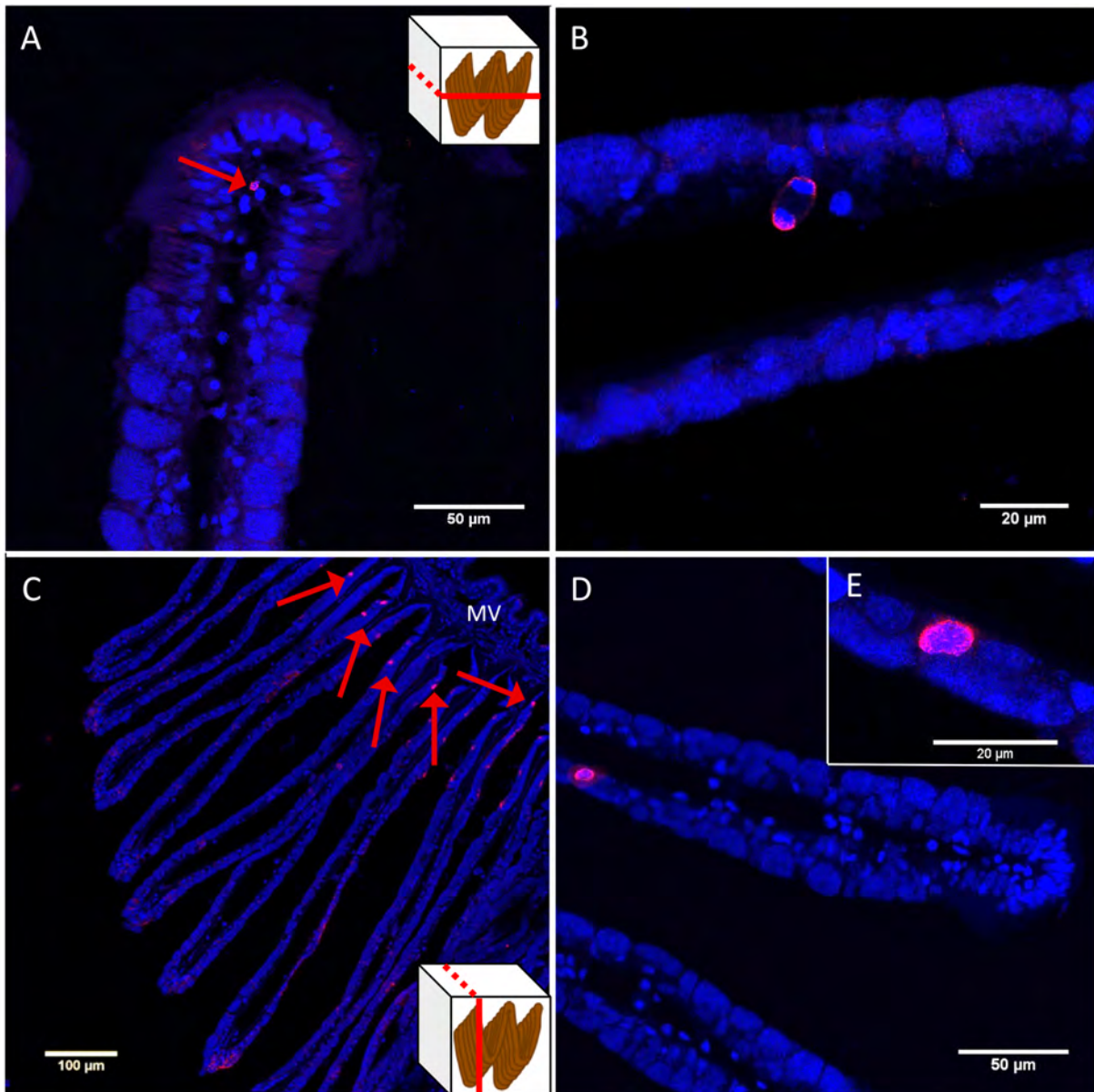


Figure 36 : Photos de la branchie de *Bathymodiolus azoricus* marquée par un anticorps anti-phospho histone H3 en microscope confocale. A) Coupe transversale d'un filament de la branchie. En bleu, le signal DAPI montrant les noyaux des cellules de l'hôte et ses endosymbiotes et en rouge la phospho-histone H3. La flèche rouge pointe sur un hémocyte en cours de mitose. B) Coupe transversale d'un filament montrant une cellule en division. C) Coupe longitudinale de la branchie montrant de nombreuses divisions cellulaires du côté dorsal près de la masse viscérale. Mv : masse viscérale D) Coupe transversale d'un filament montrant une cellule épithéliale en cours de division. E) Agrandissement de la figure D, montrant la cellule en division.

La quantité de bactéries est plus importante dans les bactériocytes près de la zone frontale et décroît jusqu'à la partie abfrontale du filament. Lors d'études en FISH sur la densité de bactéries symbiotiques, nous avons constaté une distribution hétérogène des symbiotes dans les filaments. Ceci nous a conduit à séparer la zone des bactériocytes en 3 zones pour les comptages tout au long de notre travail : la zone frontale qui possède les bactériocytes les plus chargés en

bactéries, la zone abfrontale où les bactériocytes ne possèdent pas ou très peu de bactéries et, entre ces deux zones terminales, se situe la zone médiane avec des bactériocytes moyennement chargés en bactéries (figure 37). Les résultats des comptages figurent dans le tableau ci-dessous (tableau 6). La zone frontale est la zone la plus souvent marquée suivie par la zone médiane, tandis qu'aucun noyau marqué n'a été détecté dans la partie abfrontale. D'une manière générale, très peu de noyaux marqués ont été vus, de l'ordre de 1 à 2 pour une zone donnée sur une coupe observée à l'objectif x40 (grossissement 400), quel que soit le traitement (remontée simple, pressurisée, exposition à des sulfures) et le site (Rainbow ou Menez Gwen). Aucune provenance, zone de la branchie ou condition expérimentale ne semble avoir d'influence majeure sur le niveau de marquage observé qui demeure toujours faible.

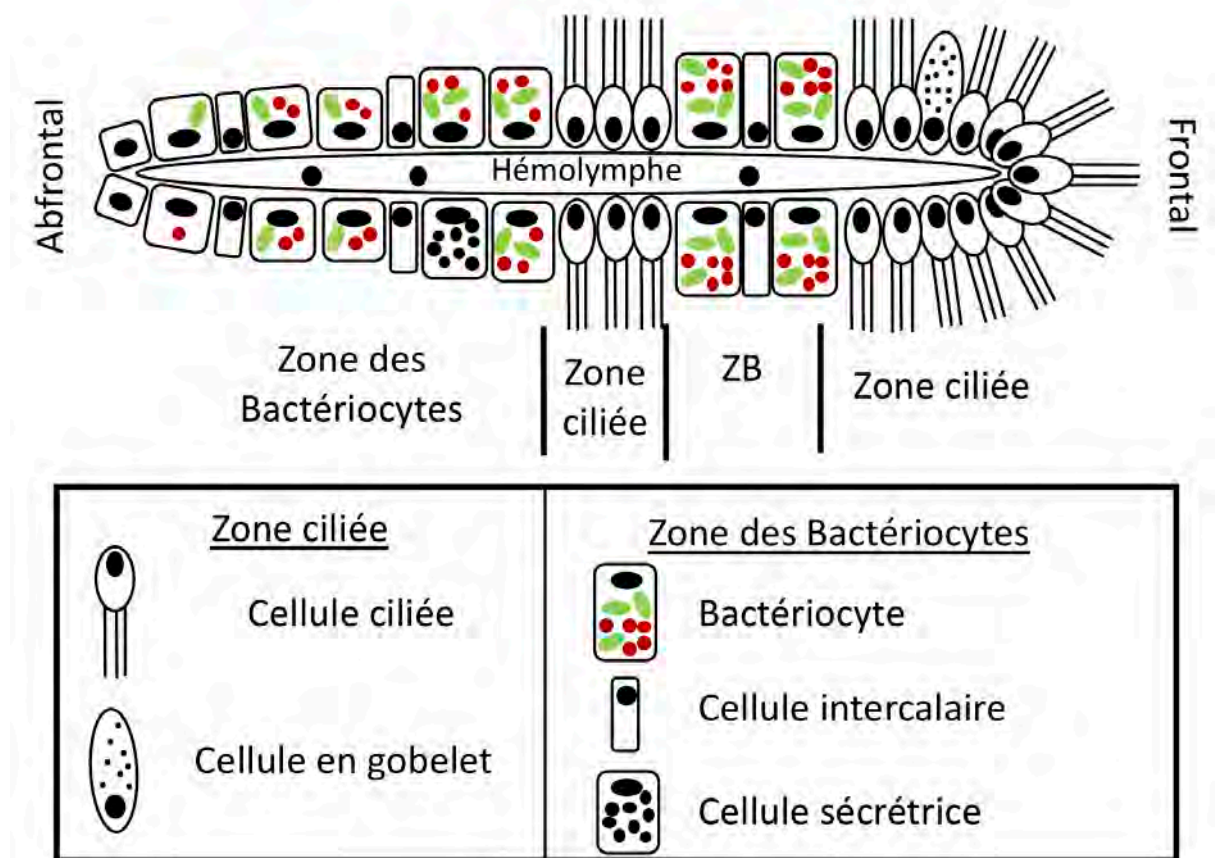


Figure 37 : Schéma d'un filament de branchie coupé transversalement. Sur le schéma, 4 zones de comptages des noyaux ont été identifiées.



Tableau 6 : Comptage des noyaux marqués par l'anticorps anti-phospho-histone H3 chez *B. azoricus*. Quatre individus du site Rainbow (tous remontées pressurisées) et 3 individus de Menez Gwen, (soit au total 8 individus, représentés par 12 lames portant chacune plusieurs filaments branchiaux) ont été analysés). ZB : zone des bactériocytes.

N°individu	Site	Condition	Nb de cellules marquées	Zone
148	Rainbow	HCO <sub>3</sub> + Na <sub>2</sub> S	1	ZB Frontale
148	Rainbow	HCO <sub>3</sub> + Na <sub>2</sub> S	2	ZB Médiane
145	Rainbow	Méthanol	1	ZB Frontale
145	Rainbow	Méthanol	2	ZB Frontale
132	Rainbow	Eau de mer	1	ZB Frontale
132	Rainbow	Eau de mer	1	Hémolymphe
132	Rainbow	Eau de mer	1	ZB Frontale
131	Rainbow	Eau de mer	1	ZB Médiane
33	Menez Gwen	Remontée Non pressurisée	1	ZB Frontale
29	Menez Gwen	Remontée Non pressurisée	1	ZB Frontale
29	Menez Gwen	Remontée Non pressurisée	2	ZB Frontale
24	Menez Gwen	Remontée pressurisée	2	ZB Médiane

Une branchie coupée longitudinalement montre beaucoup plus de noyaux marqués que les coupes transversales de filament (figure 36C). Les noyaux sont surtout localisés dans la partie dorsale de la branchie, près de la région où elle est attachée à la masse viscérale, dans une zone où le DAPI révèle une grande densité de noyaux.

Chez *Mytilus edulis*, 4 individus ont été testés pour un total d'une dizaine de lames sans qu'aucun noyau ne soit marqué (Mêmes individus que dans la partie 4.1.1).

## Discussion

Les images obtenues montrent clairement des figures de mitose permettant de valider le marquage obtenu avec cet anticorps. Le marquage semble entourer les noyaux en division. La

phospho-histone H3 permet la condensation de la chromatine lors de la mitose et sur les images, on voit une co-localisation du marquage de l'ADN par le marquage DAPI et le marquage de la phospho-histone H3 (Hendzel *et al.*, 1997). En coupe transversale, les cellules branchiales en multiplication sont essentiellement des cellules de la zone des bactériocytes. D'une manière générale, très peu de cellules en mitose ont été observées. L'anticorps utilisé marque une protéine qui intervient durant un temps très court de la multiplication *i.e.* seulement la mitose, ce qui pourrait expliquer la rareté du signal et conduire à sous-estimer la proportion de cellules en prolifération. Nous n'avons d'ailleurs pas observé de signal chez les 4 individus testés de la moule côtière *Mytilus edulis*, même si dans ce cas nous ne pouvons pas conclure si l'anticorps ne fonctionne pas chez cette espèce, ou s'il n'y avait aucune cellule en cours de mitose.

Les images obtenues sur les coupes longitudinales de branchies montrent davantage de signal, notamment une zone de prolifération plus importante au niveau du côté dorsal de l'organe branchial. Cette zone pourrait correspondre à la zone de croissance des filaments dans le sens dorso-ventral.

Le rôle de la multiplication des cellules hôtes dans l'augmentation du nombre de symbiotes suppose que ces cellules nouvellement formées puissent acquérir des symbiotes. Les symbiotes contenus dans la cellule mère pourraient se répartir entre les deux cellules filles, ou bien si la cellule mère est une cellule intercalaire dépourvue de bactéries (Fiala-Medioni *et al.*, 2002) les cellules filles pourraient acquérir *de novo* les symbiotes. Les bactériocytes voisins de la zone frontale sont notamment chargés en bactéries et pourraient donc fournir les symbiotes aux nouvelles cellules. Des auteurs suggèrent d'ailleurs que les cellules des nouveaux filaments formés dans la partie postérieure de la branchie sont colonisées par des symbiotes de tissu branchial plus ancien (Wentrup *et al.*, 2013). Sur le même modèle de transfert latéral, les nouveaux bactériocytes des filaments déjà colonisés pourraient être infectés de la même manière par les symbiotes des bactériocytes voisins, plus anciens, dans d'autres zones de la branchie. Les cellules de la zone frontale possédant plus de bactéries pourraient d'autant plus facilement infecter les nouvelles cellules.

L'étude de la prolifération cellulaire par l'approche d'immunomarquage de la phospho-histone H3 conduit sans doute à sous-estimer la densité des cellules en multiplication, et n'offre qu'un instantané du phénomène durant une phase très courte. L'étude dynamique de la prolifération suppose une approche expérimentale plus poussée qui permet de tracer les cellules s'étant récemment divisées. Nous avons donc utilisé un marqueur de prolifération différent, le BrdU, un nucléoside synthétique qui remplace la thymidine lors de la réplication de l'ADN dans le cadre

d'expérimentations *in vivo* sur des bathymodioles. La phase de réplication durant beaucoup plus longtemps et le marquage étant conservé dans les cellules filles, cette approche doit nous permettre d'obtenir beaucoup plus de cellules marquées dans le tissu branchial, et un signal intégré sur la totalité de la durée d'exposition qui puisse nous renseigner sur la quantité de cellules produites au cours de notre expérimentation.

### **3.1.2 Suivi intégré de la dynamique des cellules de l'épithélium branchial de bathymodioles par marquage BrdU lors d'expérimentations**

Pour suivre le renouvellement des cellules de la branchie, l'approche utilisant des incubations en présence de nucléoside marqué s'avère particulièrement pertinente. L'intégration de ce nucléoside dans l'ADN des cellules néoformées permet de visualiser les zones dans lesquelles a eu lieu une multiplication cellulaire au cours de l'incubation. Nous avons dans un premier temps utilisé la méthode « classique » qui est une baignade des bivalves en eau de mer avec du BrdU (5-Bromo-2'-deoxyUridine). Le BrdU est un nucléoside synthétique analogue de la Thymidine. Il est incorporé à l'ADN lors de sa réplication (Gratzner, 1982). Après fixation des tissus, le BrdU incorporé est révélé par un anticorps spécifique, qui marque ainsi les cellules qui se sont divisées pendant l'expérience (figure 38). Cette méthode a déjà été utilisée avec des résultats plus ou moins convaincants chez d'autres espèces de bivalves comme *Mytilus galloprovincialis* et *Codakia orbiculata* (Zaldibar *et al.*, 2004; Gómez-Mendikute *et al.*, 2005; Elisabeth *et al.*, 2012). Ce nouveau marquage a pour but de suivre lors d'une expérimentation les cellules qui se sont multipliées. Cet outil permet d'identifier les zones de multiplication lors de la dépuration (perte des symbiotes), ainsi qu'en cas de présence d'un substrat pour les symbiotes.



Figure 38 : Photo du dispositif permettant la baignation des moules entières avec du BrdU. Les trois bocaux sont remplis d'EDMF et placés dans un bain-marie permettant de maintenir la température à 8°C pendant toute l'expérimentation. Le tube permet un léger bullage afin de maintenir une quantité suffisante d'oxygène dans les bocaux. On peut voir que certaines moules sont ouvertes et dans le bocal témoin, on aperçoit le pied (blanc) de 2 moules de *B. azoricus* du site de Menez Gwen (remontée non pressurisée).

## Matériel et méthode

Pour étudier la multiplication des cellules, des spécimens de *Bathymodiolus azoricus* ont été récoltées lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 sur deux sites de la ride Médio Atlantique : Menez Gwen à 830m de profondeur et Lucky Strike à 2270m de profondeur. Pour plus de détails, voir la partie 2.2.1.4.

### Incubations des bathymodioles en présence de BrdU

Pour chaque baignation, des bathymodioles entières avec du BrdU, la manipulation suivante a été effectuée. Des *Bathymodiolus azoricus* (de 4 à 6cm) ont été placées dans un bocal de 2L contenant de l'EDMF à 0.22μm à 8°C +/-2°C. Un léger bullage a été mis en place afin d'oxygéner l'eau des bocaux. Le premier bocal est un témoin. Il contenait 3 moules dans de l'EDMF. Le deuxième bocal contenait 9 moules dans de l'eau de mer filtrée à laquelle a été

ajouté du BrdU à une concentration de 30mg.L<sup>-1</sup>. Le troisième bocal contenait 9 moules dans de l'EDMF avec du BrdU à une concentration de 30mg.L<sup>-1</sup>, ainsi qu'une source de soufre réduit (Na<sub>2</sub>S 36.4µM) et une source de carbone (NaHCO<sub>3</sub> 11.8µM) fournissant énergie et carbone aux symbiotes sulfo-oxydants. Les concentrations en substrats sont proches de celle de l'environnement naturel des bathymodiales (Szafranski *et al.*, 2015).

Au début de l'expérimentation, une moule de chaque bocal a été prélevée comme témoin t 0. A t = 0h, à l'aide d'une seringue, environ 1ml de l'eau du bocal de la moule en question a été injecté entre les deux valves de la moule. Ensuite, à t = 6h une moule a été prélevée du bocal témoin et trois moules dans chacun des deux autres bocal. L'opération a été renouvelée à t = 18h puis à t = 48h.

#### Expérimentations lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017, à Horta et à Roscoff

L'expérimentation décrite ci-dessus a été effectuée 10 fois sur des *Bathymodiolus azoricus* remontées de façon non pressurisée de deux sites à des profondeurs différentes et à des temps de déuration différents (tableau 7). Des moules ont été remontées du site Lucky Strike (1690m de profondeur, pour plus de détails voir la partie 2.2.1.4). Toutes les expérimentations ont été faite à bord à 4°C et dans de l'EDMF à 0.22µm. Une première expérimentation d'incubation dans le BrdU a été effectuée juste après la remontée, une seconde sur des moules maintenues 2 jours en aquarium, et une troisième sur des moules maintenues 6 jours en aquarium. Un deuxième lot de moules a été remonté du même site (Lucky Strike) et deux expérimentations BrdU ont été effectuées à 3 et 10 jours après leur remontée, les moules ayant été entretemps maintenues en aquarium dans les mêmes conditions de température et d'absence de nourriture. Le but était de suivre les premières étapes de la déuration et de comparer la multiplication des cellules dans les branchies. Mais aussi de voir si un retour de substrat pour les bactéries sulfo-oxydantes provoquerait une multiplication importante des cellules qui commencent à perdre leurs symbiotes.

Des moules recoltées (de façon non pressurisée) sur le site de Menez Gwen (830m, pour plus de détails voir voir la partie 2.2.1.4), ont été utilisées pour réaliser 3 balnéations avec du BrdU après respectivement 3, 8 et 61 jours de jeûne. Les moules restantes, non utilisées dans ces expérimentations, ont été nourries avec des microalgues et deux autres expérimentations BrdU ont été effectuées après 1 mois et 4 mois et demi de nourrissage. Ces balnéations sur des animaux qui ont perdu leurs symbiotes et qui passent à un régime strictement hétérotrophe,

nous permettent de suivre les changements qui peuvent avoir lieu dans la branchie. Son rôle d'organe accueillant les symbiotes disparaît au profit de son premier rôle, la filtration et la respiration.

Tableau 7 : Tableau listant les balnéations de BrdU effectuées sur *Bathymodiolus azoricus* lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 et à terre au Roscoff Aquarium Service. PP? : Navire Océanographique Pourquoi pas? ; Deep Lab Horta : Lab Horta est le laboratoire de l'Université des Açores basé à Horta.

Manip	Site	Condition
Manip 1 PP?	Lucky Strike (lot 1)	0 jour de jeûne/remontée
Manip 2 PP?	Lucky Strike (lot 1)	2 jours de jeûne/remontée
Manip 3 PP?	Lucky Strike (lot 1)	6 jours de jeûne/remontée
Manip 4 PP?	Lucky Strike (lot 2)	3 jours de jeûne/remontée
Manip 5 PP?	Lucky Strike (lot 2)	10 jours de jeûne/remontée
Deep Lab Horta	Menez Gwen	3 jours de jeûne/remontée
Roscoff 3/08	Menez Gwen	8 jours de jeûne/remontée
Roscoff 25/09	Menez Gwen	61 jours de jeûne/remontée
Roscoff 17/10	Menez Gwen	83 jours depuis remontée Et 29 jours de nourrisages
Roscoff 31/01	Menez Gwen	189 jours depuis remontée Et 135 jours de nourrisages

Dans le cas des *Mytilus edulis*, le bocal contenant le sulfure n'a pas été réalisé. Le sulfure est un gaz très toxique et la moule côtière ne possédant pas de bactéries sulfo-oxydantes, nous n'avons pas utilisé ce gaz qui n'aurait provoqué que la mort de l'animal (Powell and Somero, 1986). Ces *Mytilus edulis* ont été maintenues un mois dans les mêmes conditions que les bathymodiales nourries avec des microalgues avant la balnéation en présence de BrdU. Cette maintenance avait pour but de comparer des animaux dans le même état physiologique.

Pour les *Mytilus edulis*, le t = 6h a été effectué, mais pas les deux autres temps qui ont été remplacés par un t = 24h. Cette expérimentation a été effectuée une fois sur des moules côtières.

Pour chaque moule prélevée, la branchie a été divisée en 3 parties : antérieure, médiane et postérieure et chaque partie a été fixée séparément dans des tubes contenant 4% de paraformaldéhyde dans de l'eau de mer, pendant 3h à 4°C. Une partie de la glande digestive et de la gonade a été aussi fixée de la même manière

### **Révélation du marquage au BrdU**

Les branchies ont été fixées, incluses, coupées et réhydratées suivant le protocole décrit dans la partie 2.3.1. Une fois les tissus réhydratés dans du PBS 1X, ils ont été perméabilisés une première fois dans une solution contenant 0.1% de Triton X100, 5% de BSA dans du PBS 1X. Les lames ont été incubées 30min à température ambiante. Puis la seconde étape était la dénaturation de l'ADN avec un bain de HCl 0.1N sur glace pendant 10min, puis une incubation avec du HCl 2N pendant 1h à 37°C. Les branchies ont été ensuite rincées dans du PBS 1X (3 fois 10min). Les tissus ont été de nouveau perméabilisés dans la solution de PBS/BSA/Triton pendant 30min. Puis les lames ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-BrdU (Invitrogen, USA) dilué à 1:100 dans du PBS 1X pendant 2h à température ambiante. Après un rinçage dans du PBS 1X (3 fois 10min) les branchies ont été incubées avec l'anticorps secondaire (anti souris, Sigma-Aldrich, USA) couplé au fluorochrome Alexa fluor 594 ® et dilué (1/200) dans du PBS 1X pendant 1h à l'obscurité à température ambiante. Les tissus ont été ensuite rincés dans du PBS, marqué au Hoechst et le tissu a été scellé entre lame et lamelle avec du Vectashield. Les lames ont été ensuite observées au microscope confocal SP5 (Leica, Allemagne) aux longueurs d'ondes 584 à 694 nm pour le BrdU et à 400nm pour le Hoechst. Les images sont traitées à l'aide du logiciel Image J (Abràmoff *et al.*, 2004).

### **Résultats**

Pour permettre l'accès de l'anticorps au BrdU dans l'ADN, il est nécessaire d'utiliser un prétraitement à l'acide chlorhydrique (HCl 2N) qui endommage les tissus (figure 39). Comme on peut le constater sur les photos, ce prétraitement conduit à masquer des noyaux des bactériocytes. Le marquage Hoechst, qui cible l'ADN, est faible et il est même souvent difficile de trouver les filaments sous le microscope confocal. De plus, les zones ciliées sont endommagées par l'acide. Nous avons utilisé un tampon borate pour neutraliser l'acide à la fin de l'incubation avec l'acide chlorhydrique, mais sans amélioration notable. Les images obtenues sont donc difficilement exploitables.

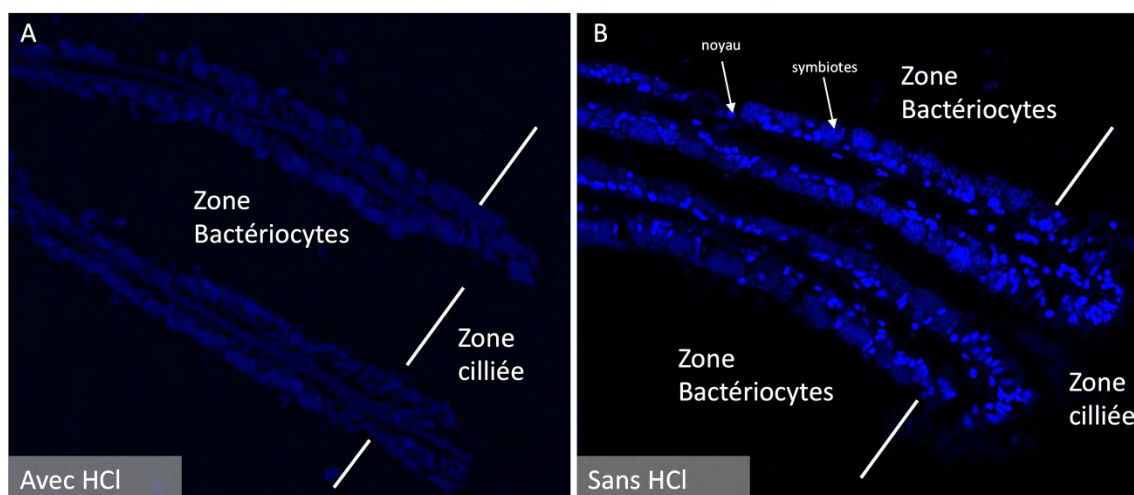


Figure 39 : Images comparant des coupes transversales de filaments de branchie de *Bathymodiolus azoricus*, marqués au Hoechst, après avoir subi ou non une perméabilisation du tissu par l'acide chlorhydrique A). L'HCl provoque un signal fluorescent plus faible et moins spécifique des noyaux, la disparition de la zone ciliée et la disparition des noyaux, facilement identifiable sans ce bain. On observe encore les bactéries mais la branchie semble amincie. B). Dans la zone ciliée, on observe seulement des noyaux et dans la zone des bactériocytes, des noyaux (rond bleu dense) et les bactéries (patches bleus plus étalés mais moins denses).

Le marquage au BrdU n'a pas donné de résultat net et convaincant (figure 40). L'anticorps ne semble pas se fixer sur une zone précise de la branchie, mais plutôt par petits grains un peu partout. Plusieurs paramètres du protocole ont été modifiés afin de tenter d'obtenir un signal plus net : changement de la concentration en HCl, différents temps d'incubation avec les produits permettant la perméabilisation des tissus et test avec la protéinase K que nous utilisons dans la méthode TUNEL pour faire entrer le fluorochrome dans le noyau (voir partie 4.1.1). Nous avons aussi testé deux couples d'anticorps primaires et secondaires (anticorps anti-BrdU, Abcam et anticorps anti-rat couplé au fluorochrome (FITC, Sigma) sans obtenir de meilleurs résultats. L'un des anticorps avait pourtant fonctionné sur des lames de tissus de roussette juvéniles avec le même protocole. Cependant aucun de ces essais n'a donné de résultat satisfaisant, ni chez *Bathymodiolus azoricus* ni chez *Mytilus edulis*.



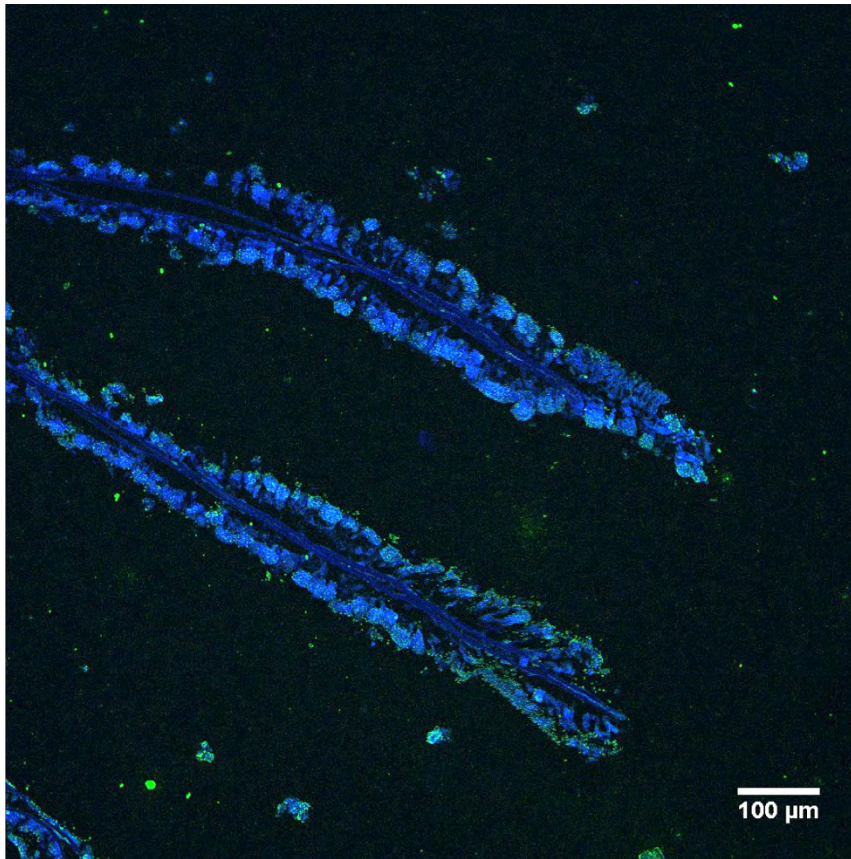


Figure 40 : Deux filaments de branchie coupée transversalement. En vert le BrdU et en bleu d'ADN marqué par le Hoechst

## Discussion

Dans le cadre de nos incubations réalisées lors de Campagnes Océanographiques et à terre au laboratoire, le marquage au BrdU n'a pas donné de résultat convaincant. En premier lieu, les bains d'HCl semblent avoir détruit les zones ciliées et ne permettent pas de visualiser les noyaux du filament branchial, ce qui rend la structure du tissu très difficile à interpréter. L'utilisation du BrdU est pourtant une méthode classique pour suivre la multiplication des cellules. Elle a été utilisée chez d'autres mollusques notamment les bivalves (Gómez-Mendikute *et al.*, 2005; Osada *et al.*, 2007; Kloiber *et al.*, 2009; Elisabeth *et al.*, 2012) et même chez des Mytilidae (Zaldibar *et al.*, 2004). Dans cette famille, Zaldibar et ses collaborateurs ont étudié l'épithélium de la glande digestive et de l'estomac de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Leur protocole ne diffère du nôtre qu'en un seul point : la méthode de fixation au Carnoy. Le Carnoy est un mélange d'éthanol, de chloroforme et d'acide acétique. Ce fixateur fait précipiter les protéines des tissus et ne « ponte » pas les structures comme les aldéhydes contenus dans le PFA peuvent le faire. Il constitue peut-être une piste d'amélioration.

L'utilisation d'incubations en présence de BrdU n'a donc pas permis de visualiser les patrons de proliférations cellulaires comme nous l'aurions souhaité, et donc de répondre à nos questions portant sur la localisation des cellules en multiplication dans les filaments branchiaux. De plus, le protocole de révélation du BrdU est long (il faut 7 heures pour réaliser la révélation du marquage BrdU) et contraignant. Une nouvelle technique reprenant le même principe d'un nucléotide synthétique intégré dans l'ADN lors de sa réplication est apparue récemment : l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). La molécule permettant la révélation du nucléotide synthétique est plus petite (Figure 41) et donc moins d'étapes de perméabilisation sont nécessaires, ce qui devrait moins altérer les tissus. Tester cette nouvelle procédure a donc constitué l'étape suivante de notre travail.

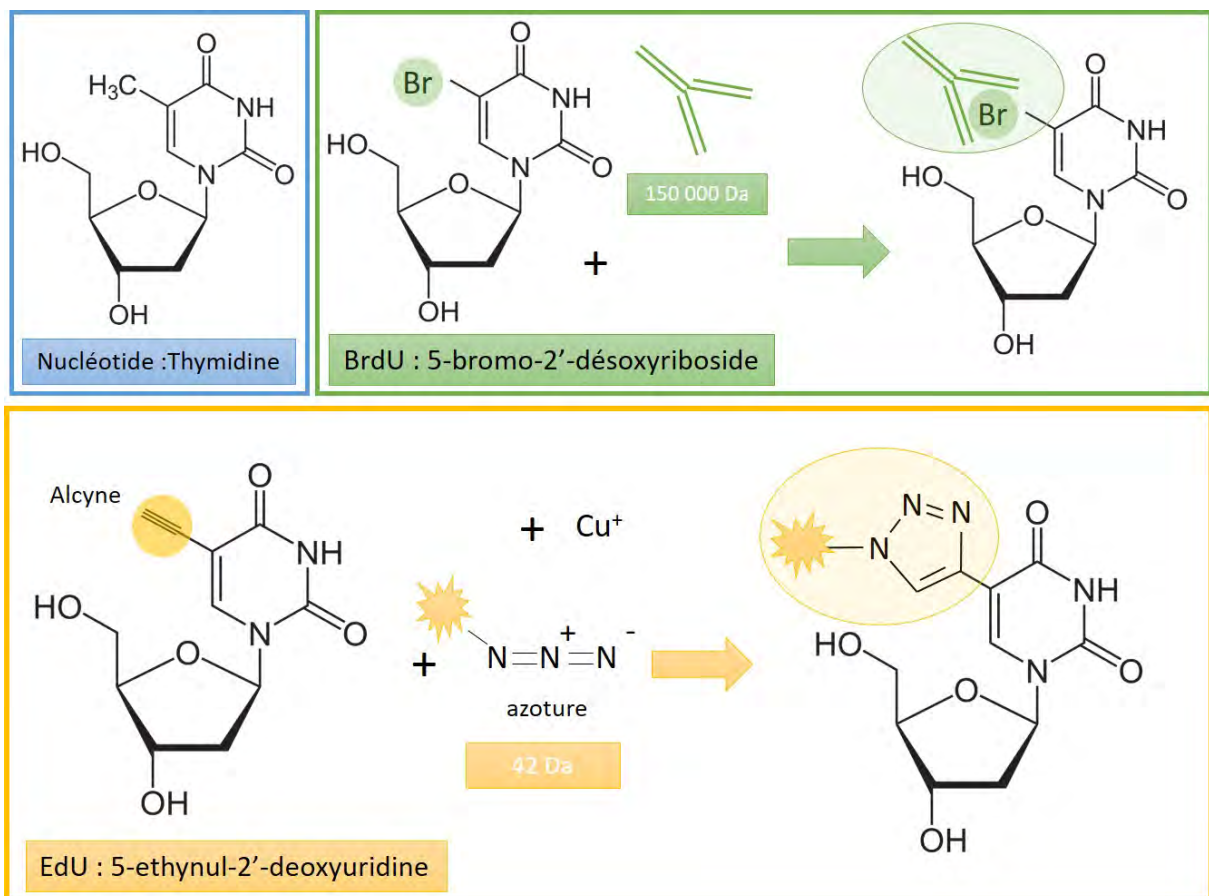


Figure 41 : Schéma comparant le BrdU et l'EdU. Encadré en bleu : le nucléotide naturel, la thymidine. Encadré en vert : Le nucléotide synthétique, le BrdU. Le groupe méthyle CH<sub>3</sub> en 5' est remplacé par un atome de Brome. Le BrdU peut être révélaté d'un anticorps qui se fixe sur l'atome de brome. Encadré en jaune : Le nucléotide synthétique, l'EdU. Le groupe méthyle CH<sub>3</sub> en 5' est remplacé par un groupe Alcyne. Une réaction dite « click-it® » permet de lier au groupe alcyne du nucléotide un azote couplé à un fluorochrome. La réaction est catalysée par des ions cuivre. Noter la différence de taille entre l'anticorps anti-BrdU et l'azote. Cette différence de poids moléculaire permet un protocole plus court pour l'EdU et moins d'étapes de perméabilisation des tissus.

### **3.1.3 Suivi intégré de la dynamique des cellules de l'épithélium branchial de bathymodiales par marquage EdU**

Un nouveau nucléoside synthétique a été développé récemment, qui peut se substituer au BrdU : l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyUridine). Il permet en particulier une révélation sans anticorps, plus rapide et sans prétraitement à l'acide (Cappella *et al.*, 2008; Neef and Luedtke, 2014) (figure 41). Ce procédé récent n'a encore jamais été utilisé sur les bivalves. Face à l'échec de notre procédure utilisant le BrdU, nous nous sommes tournés vers cette possibilité nouvelle. Nous avons eu l'opportunité de pouvoir tester cette « nouvelle génération » du BrdU lors de deux campagnes océanographiques. Un premier test lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 et un autre test plus complet lors de la campagne BICOSE 2018.

Grâce à un kit d'essai EdU, nous avons initialement prévu de comparer les marquages BrdU et EdU. Pour ce comparatif EdU/BrdU et afin d'assurer une pénétration optimale de ces composés au sein de la branchie, nous avons créé un dispositif expérimental d'incubation *ex-situ* en boîte de Petri, sur les branchies droite et gauche d'une même moule (figure 42). Cette expérience avait pour objectif de faciliter l'incorporation de l'EdU. Néanmoins, elle se fait au prix de l'intégrité du tissu, et donc du réalisme de l'incubation puisque la branchie est séparée du corps de l'animal. Afin de voir si les marquages EdU fonctionnent sur des animaux vivants, nous avons donc réalisé en parallèle une incubation sur individus entiers vivants. Finalement, le BrdU a donné des résultats peu probants et nous présenterons ici principalement les résultats obtenus avec l'EdU.

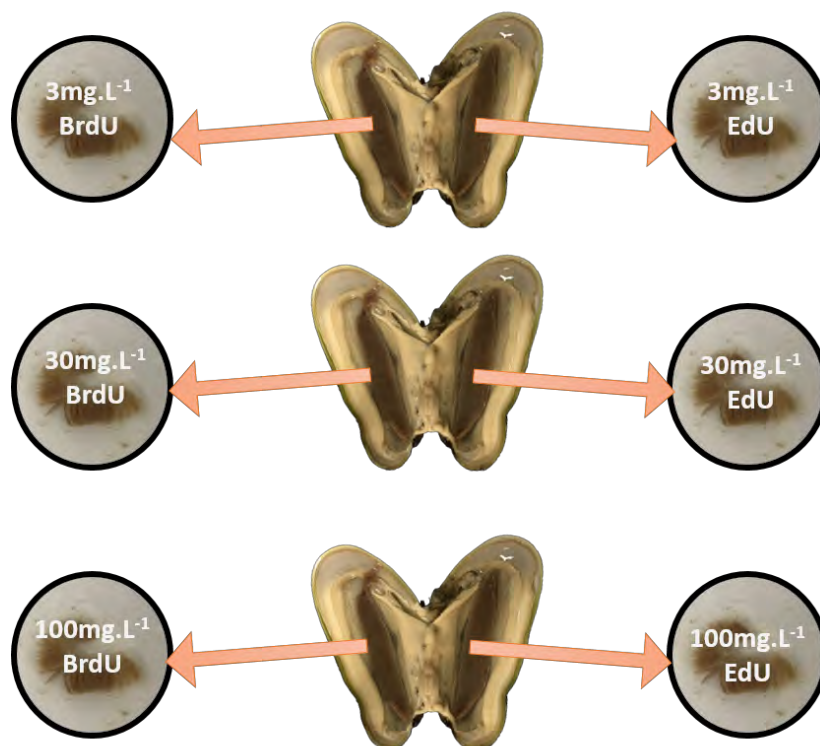


Figure 42 : Schéma de la balnéation de branchies isolées avec deux types de nucléotides synthétiques dans trois concentrations différentes afin de comparer les deux types de marquages et de trouver la concentration donnant le meilleur résultat. Test réalisé sur les moules de Lucky Strike (remontée non pressurisées) sur une durée d'incubation de 2h lors de la Campagne de MOAMRSAT/BioBaz 2017.

### Matériel et méthodes

Des moules *Bathymodiolus azoricus* ont été récoltées lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 sur le site de Lucky Strike (1690m de profondeur). Pour plus de détails voir la partie 2.2.1.4. Les moules ont été ouvertes et les branchies extraites sans endommager le tissu. Une des branchies a été placée dans une boîte de Pétri remplie avec de l'EDMF à  $0.22\mu\text{m}$  et contenant  $3\text{mg.L}^{-1}$  de BrdU. Tandis que l'autre branchie a été placée dans une boîte de Pétri remplie avec de l'EDMF à  $0.22\mu\text{m}$  contenant  $3\text{mg.L}^{-1}$  de EdU. De la même manière, une autre moule a été utilisée avec une concentration de  $30\text{mg.L}^{-1}$  et une troisième à  $100\text{mg.L}^{-1}$ . Les branchies isolées de bathymodioles sont restées 2h en balnéation avant d'être fixées. Ce dispositif a permis de déterminer la concentration optimale en BrdU et EdU pour obtenir un signal suffisant dans les branchies de moules (figure 42). Les branchies à la même concentration proviennent du même individu. Les deux branchies sont donc en théorie dans le même état physiologique. La même expérimentation a été effectuée sur des *Mytilus edulis*

maintenues un mois à l'aquarium de Roscoff (RAS) à 8°C et nourries avec des microalgues du genre *Isochrysis*. Le temps d'incubation a été augmenté de 2 à 5h.

Une branchie de bathymodioline après la remontée a été maintenue dans une boîte de Pétri avec de l'eau de mer contenant 3mg.L<sup>-1</sup> de EdU (pour plus de détail voir partie 4.2.2) pendant 48h (figure 43). Cette expérimentation faite avec une branchie isolée permet d'être sûr du temps et de la concentration d'EdU mis en contact avec les cellules contrairement aux moules entières qui restent souvent fermées un certain temps au début de l'incubation. Pour la branchie maintenue 48h dans de l'eau de mer contenant 3mg.L<sup>-1</sup> d'EdU, une partie de la branchie médiane a été incluse dans de la résine Steedman et le bloc coupé sur toute sa longueur. Quatre coupes transversales de 8µm ont été déposées par lame et deux lames ont été effectuées, ensuite une avancée de 20 coupes de 30µm a été faite sans conserver les coupes. Puis deux nouvelles lames ont été faites et ainsi de suite. En tout, 28 lames ont été réalisées tout le long de la branchie, représentant 14 points d'observation et couvrant toute la longueur de la branchie dans le sens antéro-postérieur. Ces lames permettent de regarder la multiplication des cellules tout le long de l'axe dorso/ventral et d'observer de possibles différences entre la partie dorsale et la partie ventrale. Les 14 lames ont été observées au microscope confocal et des photos ont été prises sur les 14 lames afin de suivre des filaments tout le long de la branchie.



Figure 43 : Photo de la balnéation d'une branchie isolée de *Bathymodiolus azoricus* dans de l'eau de mer contenant de l'EdU lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017. Des lames ont été placées dans le fond dans le but de permettre l'installation de potentiels symbiotes relargués par la branchie.

Lors de la campagne BICOSE 2 (voir la partie 2.2.1.5), des expérimentations sur des animaux entiers remontés, en condition pressurisée cette fois, ont pu être réalisées. Des spécimens de *Bathymodiolus puteoserpentis* ont été prélevés sur le site de Snake Pit à 3500m de profondeur. Les moules ont été remontées dans le dispositif PERISCOP permettant de les maintenir dans des conditions de pressions et de températures proches de leur environnement naturel (voir chapitre 2). Contrairement aux expérimentations menées sur les moules de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017, les dispositifs pressurisés sont obligatoires car la dépressurisation provoquerait la mort des individus en quelques heures compte tenu de la profondeur à laquelle elles ont été prélevées. Les moules ont été ensuite transférées dans l'aquarium pressurisé IPOCAMP, soit en présence de  $3\text{mg.l}^{-1}$  d'EdU, soit en présence de  $3\text{mg.l}^{-1}$  d'EdU avec des sulfures ( $\text{Na}_2\text{S}$   $36.4\mu\text{M}$ ) et d'une source de carbone ( $\text{NaHCO}_3$   $11.8\mu\text{M}$ ) pour nourrir les symbiotes sulfo-oxydants.

Des *Mytilus edulis* maintenues au RAS de Roscoff ont été incubées avec de l'EDMF en présence de  $3\text{mg.l}^{-1}$  d'EdU pendant 5h et 24h.

Toutes les branchies ont été fixées au PFA 4% dans l'EDMF. Les branchies isolées ont été fixées entières et la révélation du EdU a été faite sur la partie médiane de la branchie. Pour les balnéations de moules entières, les parties antérieures, médianes et postérieures de la branchie ont été fixées séparément.

### **Révélation du marquage EdU**

Les tissus ont été fixés, inclus en résine, coupés et réhydratés de la même manière que dans les paragraphes précédents (voir partie 2.3.1). Une fois les tissus réhydratés dans du PBS 1X, ils ont été perméabilisés dans une solution contenant 0.1% de Triton X100 et 5% de BSA dans du PBS 1X. Les lames ont été incubées 30min à température ambiante. Puis,  $100\mu\text{l}$  du Kit « click it EdU » (Invitrogen, USA) ont été déposés sur chaque lame. La solution contenait l'azoture couplé au fluorochrome, le  $\text{CuSO}_4$  qui permet de catalyser la réaction. Les tissus ont été incubés 30min dans cette solution à l'obscurité. Les lames ont été rincées trois fois au PBT et du Hoechst a été déposé sur les lames. Enfin, le tissu a été scellé entre lame et lamelle avec du Vectashield. Les lames ont été observées au microscope confocal SP5 (Leica, Allemagne) aux longueurs d'ondes 501 à 602nm pour l'EdU et 415 à 492nm pour le Hoechst.

## **Résultats**

### **Choix de la concentration en EdU**

Pour les bathymodiales ainsi que pour les moules côtières, la baignade des branchies nues a fonctionné à toutes les concentrations. Quelle que soit la concentration en EdU, le nombre de cellules marquées ne semble pas varier (figure 44). La concentration la plus faible de 3mg.L<sup>-1</sup> a donc été choisie comme condition optimale entre coût de l'expérimentation et qualité du signal.

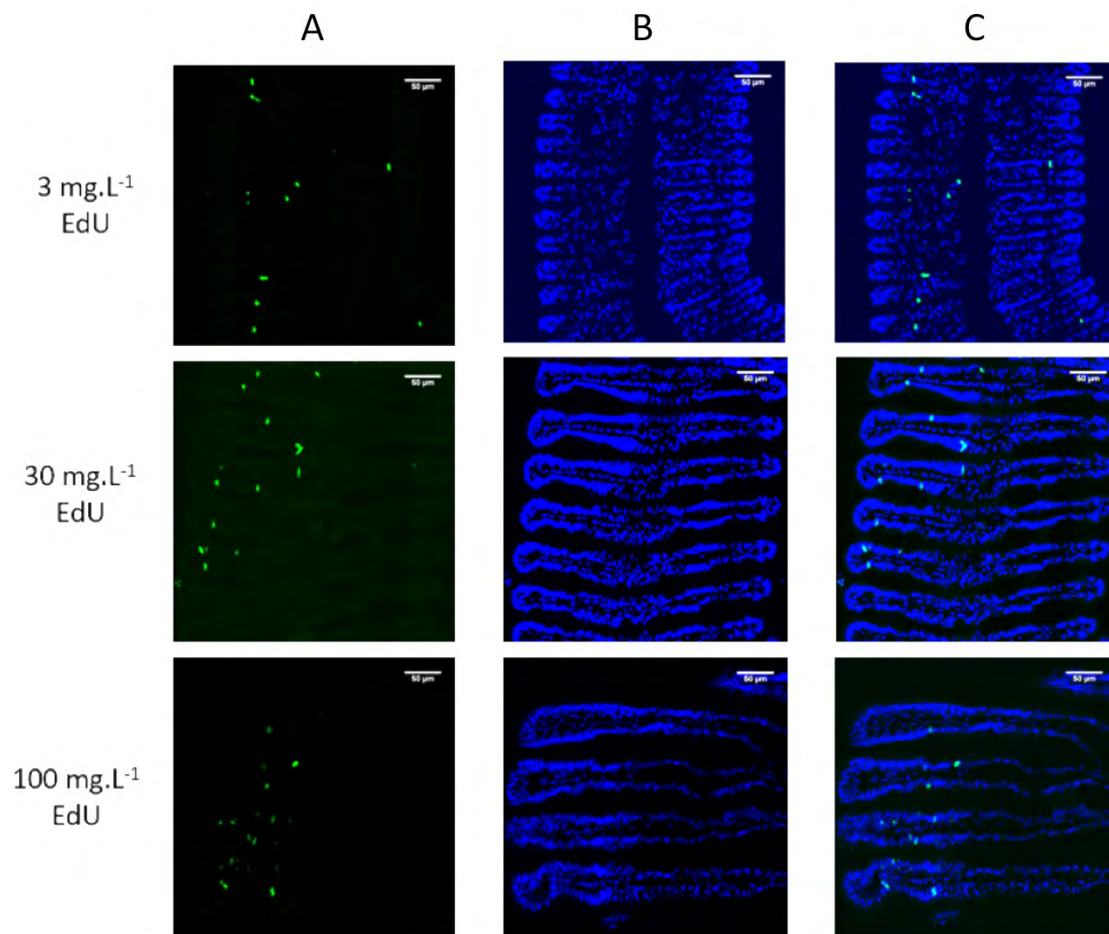


Figure 44 : Planche illustrant la multiplication cellulaire dans les branchies isolées, à trois concentrations d'EdU chez *Mytilus edulis* (3 à 100mg.L<sup>-1</sup>). A) Noyaux en multiplication cellulaire, marqués par le FITC. B) Noyaux marqués par le Hoechst. C) Superposition des deux canaux

### **Marquages EdU *ex situ* dans les branchies isolées de *Bathymodiolus azoricus* et de *Mytilus edulis***

Chez les bathymodiales, deux types de baignades de branchie isolée ont été effectuées ; une de 2h et une de 48h. Les noyaux marqués sont tous situés majoritairement dans la partie frontale du filament dans le cas des deux baignades. Dans les branchies isolées de *Mytilus edulis* mises

en présence de EdU pendant 5h, des cellules se sont multipliées tout le long de la branchie. Aucune zone de la branchie des moules côtières n'est plus marquée qu'une autre. Dans le cas de la branchie entière de *Bathymodiolus azoricus* mise en présence de EdU pendant 48h puis coupée sur toute sa longueur, sur chaque filament des cellules se sont multipliées. Dans la zone ventrale de la branchie, les feuillets ascendants et descendants sont soudés (figure 45). Donc, de chaque côté du filament se trouve une zone terminale ciliée. Les deux zones terminales ciliées comportent de nombreux noyaux marqués par l'EdU, donc un grand nombre de cellules ciliées se sont multipliées. Dans la zone des bactériocytes, proche de ces zones ciliées, les cellules possèdent un grand volume de bactéries et dans cette zone, quelques cellules semblent s'être divisées. Plus dorsalement, les deux feuillets descendants et ascendants se séparent. Il y a donc une seule zone ciliée du côté frontal et une zone de bactériocytes du côté abfrontal (figure 45). Les cellules qui se sont multipliées sont dans la zone ciliée, et dans la zone des bactériocytes proche de la zone frontale. Comparé à la zone ventrale, il semble cependant y avoir une quantité moins importante de cellules qui se sont multipliées. Nous trouvons ce même résultat sur toutes les images le long de la branchie jusqu'à la zone apicale dorsale ou la branchie rencontre la masse viscérale. Dans cette zone, les cellules ne semblent pas être différenciées (elles ne sont pas ciliées et il y a une absence totale de bactéries). De nombreux noyaux sont marqués, attestant que la zone apicale dorsale de la branchie est la zone la plus importante de multiplication cellulaire de la branchie.



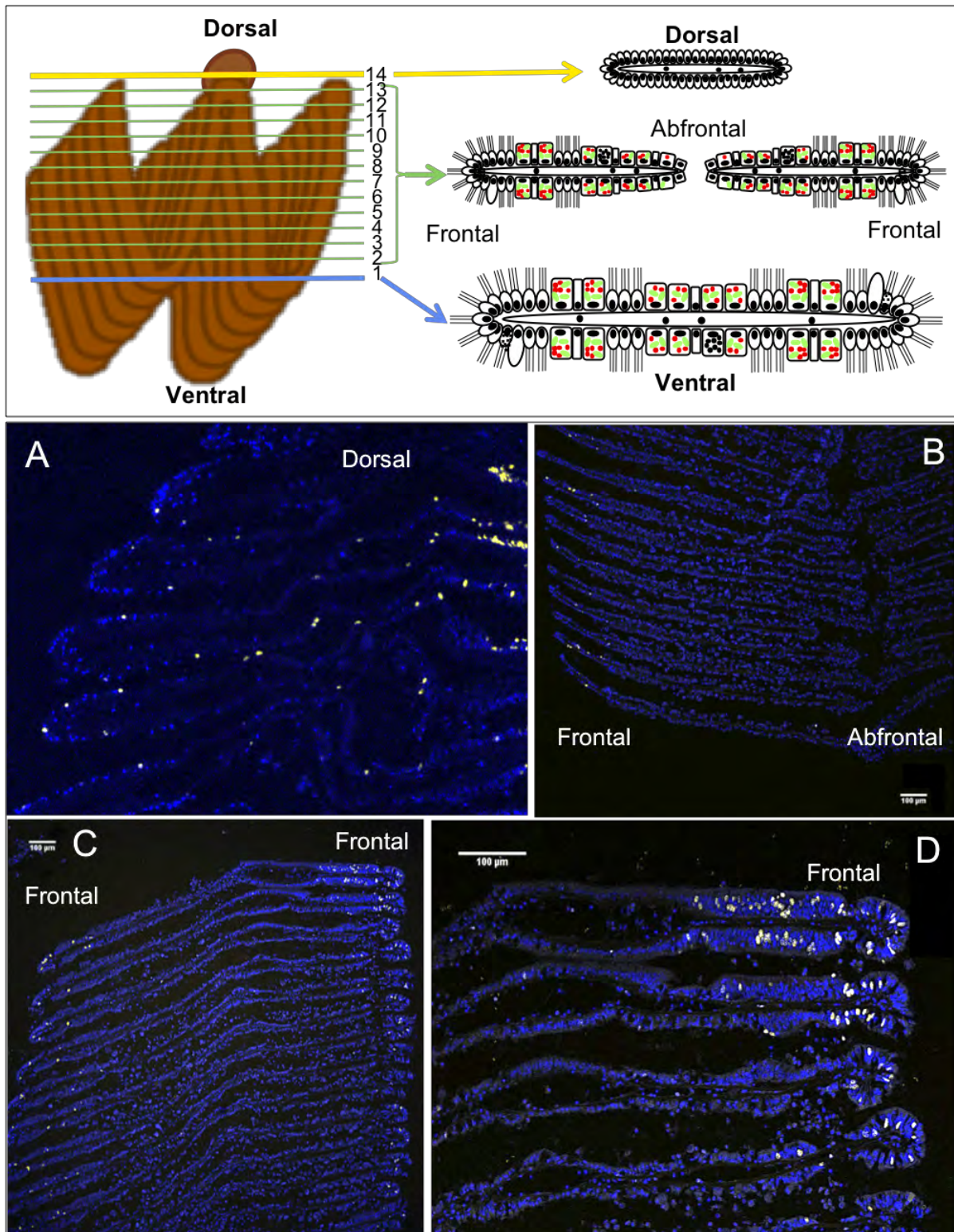


Figure 45 : Schéma montrant le marquage EdU tout le long d'une branchie de *Bathymodiolus azoricus* isolée lors d'une baignade de 48h dans de l'eau de mer contenant  $3\mu\text{g.L}^{-1}$ . Le schéma en haut à gauche représente une branchie entière et les schémas sur la droite représentent les coupes transversales que l'on obtient en coupant la branchie de la partie ventrale (coupe 1) à la partie dorsale (coupe 14). Les photos en dessous sont les coupes transversales de la branchie au niveau de coupe successifs. En bleu, le marquage Hoechst montrant les noyaux et les bactéries et en jaune le marquage EdU. A) coupe transversale dans la partie dorsale de la branchie (niveau coupe 14) on note le nombre important de noyaux marqués. B et C) coupe transversale de la partie médiane de la branchie (niveaux coupes 6-7).

D) coupe transversale de la partie ventrale de la branchie (niveau coupe 1). Les marquages EdU sont essentiellement localisés dans la partie frontale des filaments qui sont au contact avec l'eau de la cavité palléale.

Dans le cas de la branchie isolée dont la balnéation a duré 2h, le même schéma de multiplication est observé mais avec un nombre de cellules marquées plus faible (figure 46).

Les noyaux qui se sont multipliés lors de l'expérimentation sur les bathymodiales sont localisés dans la zone ciliée et dans la zone frontale de la zone des bactériocytes, celle contenant le plus de bactéries.

Pour des raisons de contraintes sur le bateau, les bathymodiales ont été maintenues au contact avec l'EdU seulement 2h, contre 5h pour les *Mytilus edulis* (afin d'assurer un marquage).

Le marquage EdU sur branchie isolée fonctionne parfaitement et donne un signal sans ambiguïté. La forme de la branchie est bien conservée, contrairement à la révélation du BrdU et cela pourrait permettre une comparaison avec d'autres marquages.

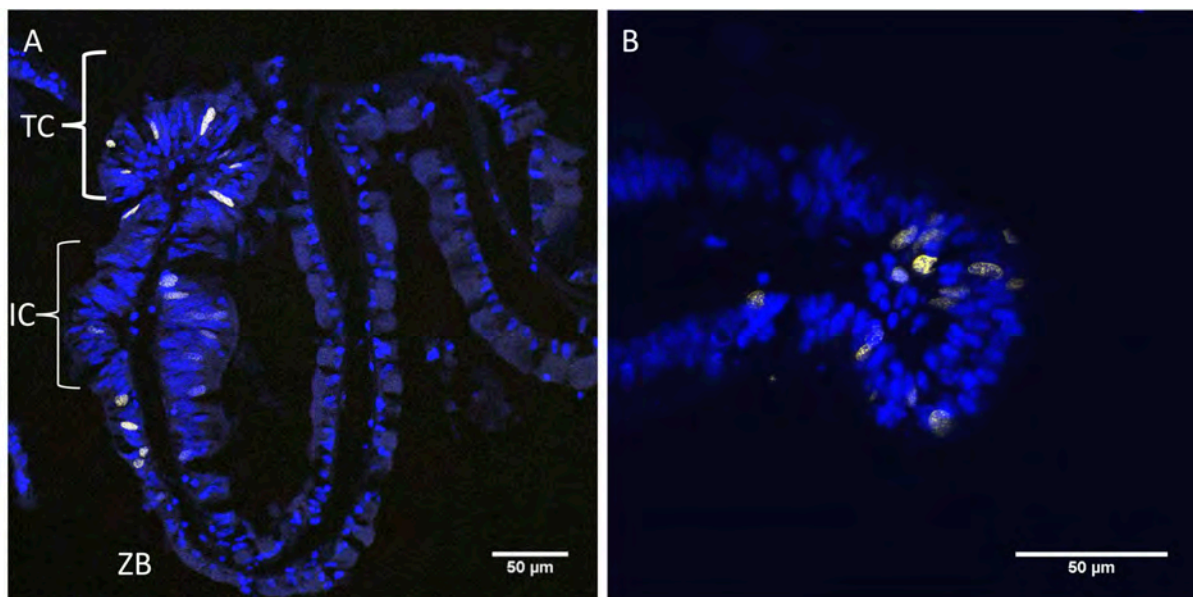


Figure 46 : Photo de filaments de branchie de *Bathymodiolus azoricus* marquée par du EdU. Les deux photos ont été prises sur des branchies isolées et incubées avec une solution contenant  $3\text{mg.L}^{-1}$  d'EdU. En bleu le marquage Hoechst montrant les noyaux et les bactéries et en jaune les noyaux des cellules qui se sont multipliées pendant l'incubation. A) Un filament de branchie avec une zone ciliée frontale (TC : Terminaison Ciliée), une zone ciliée intercalaire (IC : interjonction ciliée) et la zone des bactériocytes. B) Détails d'une terminaison ciliée.

### Résultats des marquages EdU en balnéation sur moule entière de *Bathymodiolus azoricus* et *Mytilus edulis*

Les incubations durant 5h sur spécimens entiers donnent des résultats moins nets. Sur une *B. azoricus*, le marquage EdU ne semble pas avoir fonctionné car elle est probablement restée fermée, alors que sur un autre individu nous obtenons un marquage, signe de multiplication cellulaire. Les autres moules doivent encore être observées. Sur les *Mytilus edulis* ayant passé 5h en présence d'EdU, sur 3 moules, une seule montre des marquages EdU. Cette moule est la seule que nous avons observée ouverte lors des 5h de balnéations. Toutes les moules côtières maintenues 24h en présence d'EdU sont marquées. Dans l'ensemble pour les deux espèces, pour les spécimens où le marquage a fonctionné, les cellules marquées sont localisées dans les mêmes zones que dans les branchies isolées (figure 47).



Figure 47 : Photo prise au microscope confocal de filaments de branchie de *Bathymodiolus puteoserpentis* du site de Snake Pit (remontée pressurisée et balnéation en aquarium pressurisée) marqués par du EdU. En bleu le marquage Hoechst montrant les noyaux et les bactéries et en jaune les noyaux des cellules qui se sont multipliées pendant l'incubation.

## Discussion

Ce premier essai de marquage à l'EdU, un nouveau nucléoside synthétique, se révèle concluant. Pour la première fois cette technique a été utilisée sur des Mytilidae. Le marquage est net et intense, permettant de bien le différencier du bruit de fond quasi nul, et les tissus conservent un aspect convenable sous le microscope. Nous avons vu peu, voir pas de marquage non spécifique. L'EdU ne nécessite pas d'étape destructive du tissu comme les bains à l'acide chlorhydrique obligatoire pour la révélation du BrdU (Gratzner, 1982), ce qui permet de préserver l'aspect des tissus. De plus, la révélation de l'EdU est plus rapide que le BrdU, prenant environ 2h contre 7h de manipulation. Nos expériences ont permis de déterminer qu'une concentration de  $3\text{mg.L}^{-1}$  d'EdU est nécessaire pour marquer les cellules qui se multiplient. L'EdU se révèle donc plus facile d'emploi et produit de meilleurs résultats que le BrdU utilisé dans le chapitre précédent. Il est clairement à recommander pour de prochaines expérimentations. Le seul inconvénient, que partagent le BrdU et l'EdU, est la dégradation de la molécule au bout de 5h, ce qui limite la durée des incubations ou bien impose de renouveler régulièrement l'apport (information selon la source du fournisseur Invitrogen).

Nos expérimentations avaient pour principal objectif de tester la faisabilité et la pertinence de l'approche EdU. Les observations fournissent néanmoins déjà des informations intéressantes, quoique préliminaires, sur la prolifération cellulaire. Lors des balnéations de moules entières, un problème est de savoir à quel moment la branchie est entrée en contact avec le produit. En effet, les moules côtières ainsi que les moules hydrothermales ne sont pas restées ouvertes pendant tout le temps de l'expérimentation. Dans le cas des *Bathymodiolus azoricus*, les sites étant moins profonds (Menez Gwen 830m et Lucky Strike 1690m), les moules ont été maintenues à la pression atmosphérique. Afin d'assurer le contact entre le nucléoside synthétique et la branchie, l'eau des bocalux a été injectée entre les deux valves de la moule et nous savons donc quand la branchie a été en contact avec le produit. Dans le cas de *Bathymodiolus puteoserpentis*, les moules proviennent du site Snake Pit à 3500m donc plus profond. Les moules ne pouvant pas survivre le temps de l'expérimentation à la pression atmosphérique, elles ont été placées dans l'aquarium pressurisé IPOCAMP, ce qui ne permettait pas de réaliser ce type d'injection forcée (Pradillon *et al.*, 2004; Pradillon and Gaill, 2007; Shillito *et al.*, 2014). Donc l'EdU n'a pas pu être injecté entre les valves de la moule et nous ne savons pas à quel moment il est entré en contact avec le tissu branchial, puisque cela ne se produit que si les valves et/ou le siphon inhalent s'ouvrent. Cependant, nous avons constaté une

multiplication cellulaire chez *B. puteoserpentis*, attestant que les branchies ont bien été en présence (à un moment ou un autre) de l'EdU. Dans le cas de *Mytilus edulis*, pour pouvoir comparer avec *Bathymdiolus puteoserpentis*, l'EdU n'a pas non plus été injecté. Toutes ne sont pas ouvertes au même instant, donnant ainsi des variations importantes d'un individu à l'autre. Pour de futures études quantitatives, il apparaît donc très important de prendre en compte le comportement d'ouverture-fermeture des valves qui peut avoir une influence considérable sur la quantité de signal qui sera mesurée, ce qui conduit à suggérer un suivi vidéo systématique et individualisé.

La localisation des cellules qui se sont multipliées apparaît différente entre les espèces. Chez la moule côtière, des cellules sont marquées tout le long du filament, qui est entièrement cilié, alors que chez *Bathymdiolus azoricus* et *B. puteoserpentis* de la rive Médio-Atlantique, les cellules marquées sont toujours localisées principalement dans les zones ciliées et dans la zone des bactériocytes du côté frontal (*i.e.* proche de la zone ciliée). La multiplication des cellules ciliées pourrait être due à un besoin important de remplacement de ces cellules, soit un turnover important de celles-ci. Les cellules ciliées permettent de créer un mouvement d'eau (Fiala-Medioni *et al.*, 2002; Grizel *et al.*, 2003). Ce courant apporte aux cellules l'oxygène mais aussi les substrats nécessaires aux symbiotes dont le sulfure, un composé toxique pour la respiration aérobie (Powell and Somero, 1986). Ces cellules ne possèdent pas de symbiotes, donc elles ne sont pas protégées par les bactéries qui consomment le sulfure (Arndt *et al.*, 2001). De plus, l'eau des moulières est également chargée en d'autres composés toxiques dont certains pourraient provoquer la mort des cellules de la zone ciliée, qui devraient alors se multiplier pour remplacer les cellules détruites (Charlou *et al.*, 2002; Kádár and Costa, 2006; Kádár *et al.*, 2006). Une autre hypothèse serait que les branchies hypertrophiées des bathymdodiales imposent une activité supérieure des cellules que chez les moules côtières, activité accrue qui provoquerait une production excessive de ROS. Ces ROS pourraient provoquer la mort par apoptose de ces cellules qui devraient alors être remplacées (Elmore, 2007).

En comparant les marquages à l'EdU aux marquages réalisés dans la partie 3.1.1 sur la phospho-histone H3, on a constaté une quantité plus importante de cellules marquées avec l'EdU. On constate également que les marquages EdU ont montré la multiplication des cellules de la zone ciliée, une zone qui ne donnait pas signal avec la phospho-histone H3. La différence entre les deux signaux est sans doute liée à la méthodologie employée. Le marquage de la phospho-histone H3 ne visualise que la mitose effective au moment où elle se produit et non pas sa phase préparatoire de réplication d'ADN qui est beaucoup plus longue dans le temps (Hendzel *et al.*,

1997; Schafer, 1998). De plus, une fois la mitose terminée, rien ne subsiste qui permette de voir qu'elle vient d'avoir lieu. Le marquage EdU permet tout à la fois de visualiser la phase préparatoire au cours de laquelle le nucléoside synthétique est incorporé lors de la réplication, de même que les cellules filles puisqu'elles contiennent l'ADN enrichi en ce nucléoside (Cappella *et al.*, 2008). Ceci explique pourquoi les marquages sont bien plus nombreux avec l'EdU. Les deux méthodes s'accordent par ailleurs sur un point. Sur les images de coupe longitudinales de la branchie, une zone de croissance a été mise en évidence par la phospho-histone H3, et par l'EdU, localisée près de la masse visérale, dans la partie la plus dorsale des lamelles branchiales qui semble donc être un lieu de croissance intense de la branchie.

Les cellules de la zone des bactériocytes qui se multiplient sont en général localisées dans la zone où les bactériocytes possèdent le plus de symbiotes, *i.e.* proche de la zone ciliée. Comme vu dans le paragraphe 3.1.1, les anciens filaments possédant des symbiotes pourraient infecter des nouveaux filaments qui ne possèdent pas encore de symbiotes (Wentrup *et al.*, 2014; Laming *et al.*, 2015). Les cellules qui se multiplient dans la zone des bactériocytes pourraient être des cellules épithéliales indifférenciées, voir des cellules intercalaires qui se différencient en bactériocytes et qui pourraient être infectées par les symbiotes des bactériocytes voisins. Dans ce cas, ceci laisse penser que les cellules intercalaires pourraient être des cellules souches. Une cellule souche qui se divise en deux cellules filles donne une nouvelle cellule souche et une cellule qui se différencie pour remplacer une cellule d'un type manquant.

## **3.2 MULTIPLICATION DES BACTERIES ENDOSYMBIOTIQUES**

### **3.2.1 Observation de la multiplication bactérienne par immunohistochimie d'un marqueur de la division bactérienne, FtsZ et au microscope électronique à transmission (MET)**

Les bactéries endosymbiotiques peuvent se multiplier à l'intérieur de leur hôte. Ce phénomène est très bien documenté chez la sépiole *Euprymna scolopes* et le charançon *Sitophilus granarius*. (Nyholm and McFall-Ngai, 2004; Vigneron *et al.*, 2014). Chez les bivalves possédant des symbiotes chimiotrophes, l'exemple de *Codakia orbicularis* est intéressant puisque l'hôte empêche cette fois ses symbiotes de se diviser (Caro *et al.*, 2007). Il y a bien réplication du matériel génétique mais pas de division observable. Chez les bathymodioles, des figures de division ont été documentées en microscopie électronique (Fiala-Medioni *et al.*, 2002; Duperron *et al.*, 2005; Salerno *et al.*, 2005) mais aucune étude systématique n'a été

menée, et l'on peut s'interroger sur la capacité des symbiotes à se diviser à l'intérieur du bactériocyte.

La microscopie électronique ne permet pas de visualiser un grand nombre de cellules par rapport à la microscopie à fluorescence et au marquage FISH par exemple. Donc nous avons utilisé une approche parallèle, afin de mettre en évidence la division des bactéries par un marquage sur une protéine impliquée dans la formation de l'anneau de cytotélière, la protéine FtsZ. FtsZ est une protéine clé de la division des procaryotes. Cette protéine forme un anneau qui permet la division des bactéries (Bi and Lutkenhaus, 1991). Cette protéine peut être détectée grâce à un anticorps mis au point chez *Escherichia coli*, qui est une *Gammaproteobacteria* (Voskuil *et al.*, 1994; Jennings *et al.*, 2011). Les symbiotes des bathymodiales étant aussi des *Gammaproteobacteria*, nous voulions tester cet anticorps afin de voir si les bactéries pouvaient se diviser à l'intérieur des vacuoles du bactériocytes. Cet anticorps a été utilisé avec succès chez des bactéries en culture et chez des ectosymbiotes d'un nématode marin (Pende *et al.*, 2014), et nous avons donc tenté de l'appliquer aux bathymodiales.

## **Matériel et méthode**

### **Echantillons pour FtsZ**

Pour étudier la multiplication des symbiotes, des spécimens de *Bathymodiolus azoricus* ont été récoltés lors de la campagne BioBaz 2013 sur deux sites de la ride Médio Atlantique : Menez Gwen à 830m de profondeur et Rainbow à 2270m de profondeur. Les moules ont été remontées grâce à PERISCOP, un dispositif permettant de garder les moules à une pression et une température proche du fond.

Les moules ont été transférées immédiatement après la récupération dans IPOCAMP en présence de substrats pour les bactéries symbiotiques. Pour plus de détails voir partie 2.2.1.2 sur l'échantillonnage.

### **Immunolocalisation de FtsZ**

Les lames utilisées pour l'immunolocalisation de la protéine FtsZ proviennent des mêmes individus utilisés pour tester la phospho-histone H3 de la partie 3.1, échantillonnés lors de la campagne BioBaz 2013. Le protocole est exactement le même sauf qu'avant l'étape de perméabilisation du tissu, les lames ont été incubées avec une solution de 0.1% de lysozyme à 37°C pendant 20 min (1 mg/ml) afin de détruire les parois cellulaires et bactériennes, pour

permettre l'entrée de l'anticorps anti-FtsZ (Agrisera, Suède; 1:100). Puis une révélation avec un anticorps secondaire anti-lapin (Invitrogen, dilution 1:500) couplé à un fluorochrome Alexa Fluor 488 a été effectuée. Les lames ont été ensuite observées au microscope confocal SP5 (Leica, Allemagne) aux longueurs d'onde 505 à 555nm pour FtsZ et à 400nm pour le DAPI.

### **Echantillons pour Microscopie électronique**

Des *Bathymodiolus azoricus* ont été récoltées de façon non pressurisée lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 sur deux sites de la ride Médio Atlantique : Menez Gwen (830m de profondeur) et Lucky Strike (1690m de profondeur) (pour plus de détails voir la partie 2.2.1.4). Les moules une fois à bord ont été aussitôt disséquées et quelques filaments de la partie médiane de la branchie ont été fixés pour l'immunohistochimie et la microscopie électronique (voir ci-dessous). Les échantillons ont été fixés, inclus et coupés comme décrit dans la partie 2.3.2.

### **Résultats**

L'immunomarquage de la protéine FtsZ a produit des résultats peu concluants malgré différents essais et modifications du protocole. Dans la figure 48, le signal FtsZ ne semble pas être co-localisé avec le signal DAPI des symbiotes. Il semble se situer au sein du cytoplasme des bactériocytes, peut être au niveau des mitochondries. Notre anticorps croise peut-être avec des mitochondries en multiplication dans les bactériocytes. Nous avons testé différents temps d'incubation avec l'anticorps primaire, différents produits perméabilisants (Triton, protéinase K, ...) et différentes concentrations, temps et températures avec les lysozymes, sans amélioration notable des résultats.



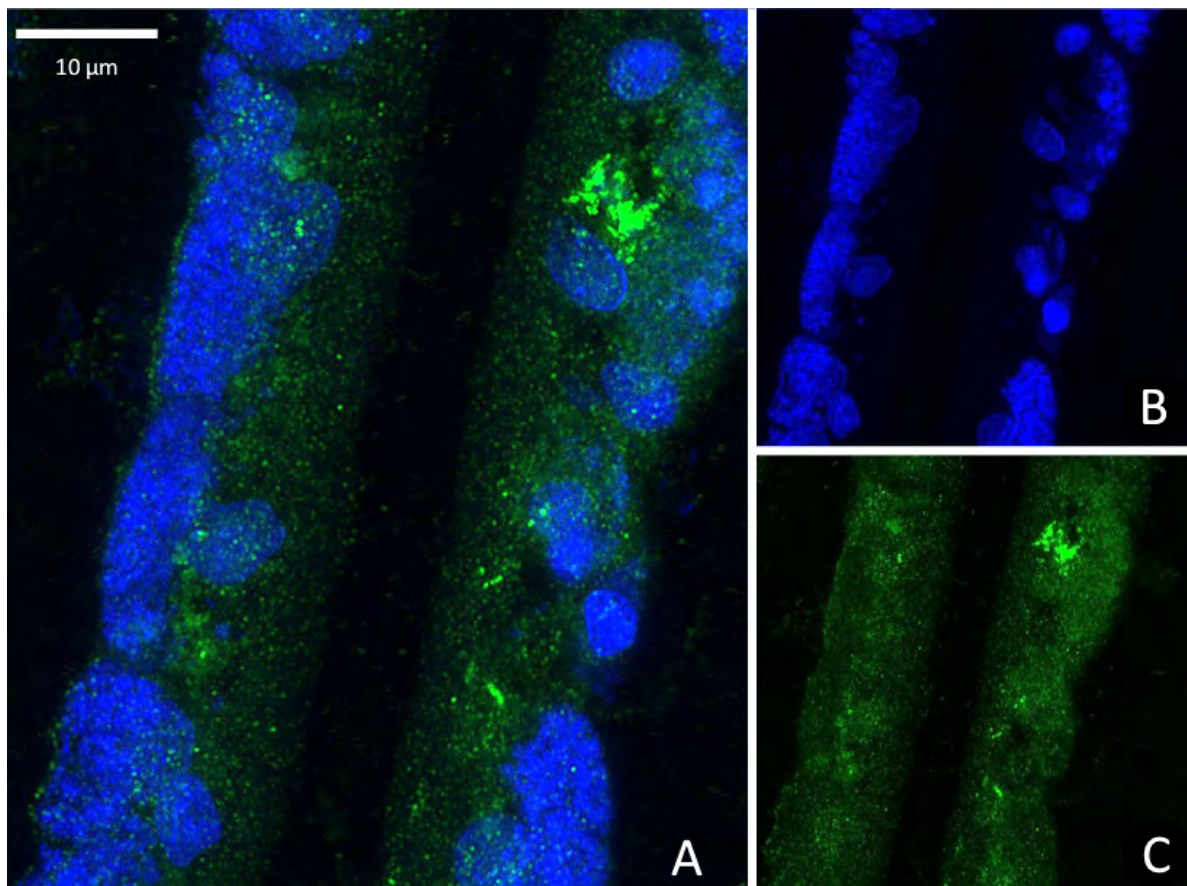


Figure 48 : Photo d'un marquage à l'aide d'un anticorps anti-FtsZ sur un filament branchial de *Bathymodiolus azoricus* observé au microscope confocal A) Filament branchial de *B. azoricus* avec en bleu le signal DAPI qui montre l'ADN des noyaux et des bactéries et en vert le signal FtsZ. B) Photo du même filament montrant uniquement le signal DAPI. C) En vert sur le même filament le signal de la protéine FstZ qui ne semble pas être co-localisé avec les bactéries endosymbiotiques, mais davantage du côté basal des bactériocytes, où les mitochondries sont abondantes (sans qu'on puisse à ce stade montrer que le signal soit associé aux mitochondries).

L'étude en microscopie électronique a permis de visualiser les filaments branchiaux de la zone médiane de la branchie de deux individus de *B. azoricus* du site Menez Gwen et un individu de Lucky Strike, fixés juste après leur remontée (en mode non pressurisé). Les bactériocytes, situés dans les branchies, reposent sur une lame basale en contact avec l'hémolymphe, tandis que leur partie apicale présente des microvillosités cytoplasmiques en contact avec l'eau de mer qui circule autour de la branchie du bivalve. Les noyaux des bactériocytes sont généralement basaux, proches de la lame basale. Dans la zone apicale, près de l'eau, les vacuoles observées contiennent seulement quelques symbiotes dans les premiers micromètres. Le nombre de bactéries par vacuole semble augmenter dans les vacuoles à mesure que l'on descend vers la lame basale. Chez *B. azoricus* de Menez Gwen toutes nos observations (7 individus, y compris les individus qui ont jeûné) ont montré des vacuoles contenant soit des SOX, soit des MOX,

mais jamais les deux ensemble dans la même vacuole, contrairement aux 3 individus de *B. azoricus* de Lucky Strike qui présentaient tous des vacuoles à la fois homosymbiotiques (SOX et MOX ségréguées) et hétérosymbiotiques (vacuole avec SOX et MOX ensemble).

A l'intérieur de ces vacuoles, comme visible sur la figure 49A, les flèches montrent parfois deux zones bien distinctes d'ADN qui sont ségréguées à chaque extrémité d'une bactérie sulfuroxydante dont la membrane présente une invagination, suggérant la division de la bactérie en deux cellules-filles. Dans l'image B de la figure 49, on peut observer la division possible de deux bactéries méthanotrophes. Ces divisions ont été observées de façon récurrente chez tous les individus, qu'ils soient de Menez Gwen ou de Lucky Strike.

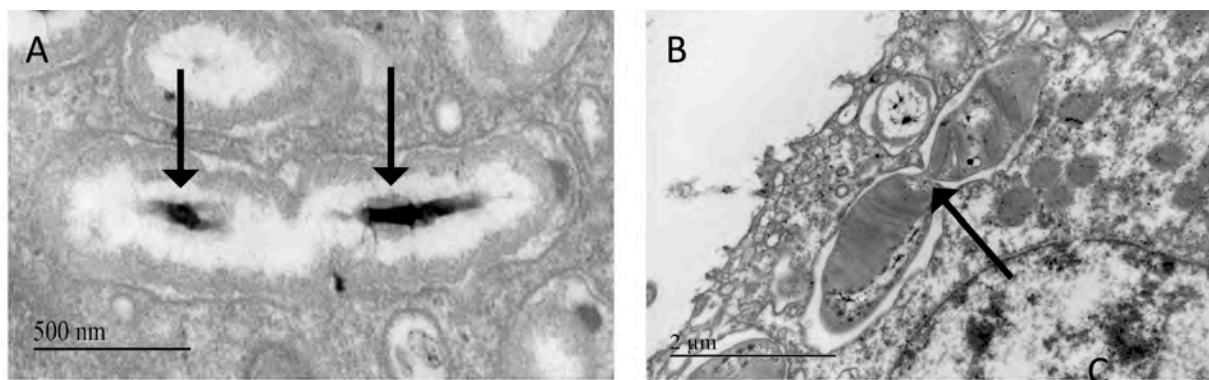


Figure 49 : Photo en MET de *Bathymodiolus azoricus* montrant des figures de division de symbiotes A) Figure de division de deux bactéries sulfuroxydantes. Les flèches en noir montrent les deux jeux d'ADN. B) Figure de division de bactéries méthanotrophes. La flèche montre que les deux bactéries sont encore reliées.

## Discussion

Notre approche initiale visait à tester si l'exposition à des substrats de symbiotes favorisait leur multiplication (source de carbone et sulfures supposés aider la croissance des SOX), et nous souhaitions mesurer le taux de bactéries en division. Cependant, l'immunomarquage de FtsZ, une protéine très conservée chez les *Gammaproteobacteria* (Vaughan *et al.*, 2004), n'est pas très convaincant et la résolution au confocal ne permet pas de dire s'il s'agit bien de divisions des bactéries symbiotiques. Ce résultat n'est peut-être pas si surprenant puisque les études précédentes avaient concerné soit des cultures bactériennes, évitant ainsi les bruits de fond dus aux tissus animaux, soit des ectosymbiotes de très grande taille peuplant la surface de la cuticule de nématodes, ce qui limitait l'interférence des cellules hôtes sur le signal (Leisch *et al.*, 2012;

Pende *et al.*, 2014). Un protocole plus efficace pour le FtsZ pourrait peut-être permettre d'automatiser un comptage et de faire des comparaisons statistiques.

Par contre, la microscopie électronique montre des figures claires de multiplication des symbiotes, aussi bien les SOX que les MOX. Bien qu'en MET les surfaces de branchies observées soient beaucoup plus restreintes qu'en microscopie confocale, des divisions ont été constatées sur chaque grille chez tous les individus observés, provenant aussi bien du site Menez Gwen que du site Lucky Strike (3 individus fixés immédiatement à la remontée, mais aussi chez les 7 individus maintenus en jeûne ou renourris, voir la partie 7.1). Nos observations nous permettent de conclure que, s'il n'y pas de grandes zones tissulaires où tous les symbiotes se divisent simultanément, ils se divisent sporadiquement de façon discontinue, mais récurrente dans les bactériocytes, quelles que soient les conditions physiologiques de l'hôte.

### **3.3 ENDOCYTOSE DE BACTERIES ENVIRONNEMENTALES**

Un dernier mécanisme cellulaire permettant d'augmenter la quantité de symbiotes à l'intérieur du bactériocytes a été exploré au cours de cette thèse : l'endocytose de nouvelles bactéries. Durant cette thèse, nous ne nous sommes pas penchés sur les mécanismes d'endocytose en particulier. Toutefois, de nombreuses images en MET ont été obtenues, notamment sur les individus tout juste remontés des sites de la ride Médio Atlantique (pour plus de détails voir partie 4.3). Sur nombre de ces photographies, nous avons pu observer des figures possibles d'endocytose ou d'exocytose (figure 50). Ces images ne nous permettent pas de conclure si ces bactéries rentrent ou sortent de la cellule. Mais des images montrant ce type de figure chez *Bathymodiolus azoricus* et *B. puteoserpentis* ont déjà été publiées et les auteurs ont proposé suite à ces observations que les bactériocytes seraient capable d'endocyter de nouvelles bactéries (Won *et al.*, 2003; Salerno *et al.*, 2005). Ce mécanisme pourrait constituer un mode d'acquisition précoce des symbiotes au cours du développement comme suggéré par plusieurs études (Wentrup *et al.*, 2014; Laming *et al.*, 2015), et sa subsistance à l'âge adulte pourrait permettre la poursuite de cette acquisition tout au long de la vie, à la fois dans les branchies néoformées (Wentrup *et al.*, 2014) et suite à des épisodes de perte massive de symbiotes (Kádár *et al.*, 2005). Mais ces figures pourraient aussi être des bactéries en cours d'exocytose par le bactériocyte, et illustrer le phénomène de relargage que nous explorons plus loin, car il n'est pas évident de déterminer dans quel sens se déroule le mouvement. De plus amples recherches sur l'endo- et l'exocytose des bactéries sont nécessaires afin de mieux comprendre le mécanisme d'acquisition des symbiotes.

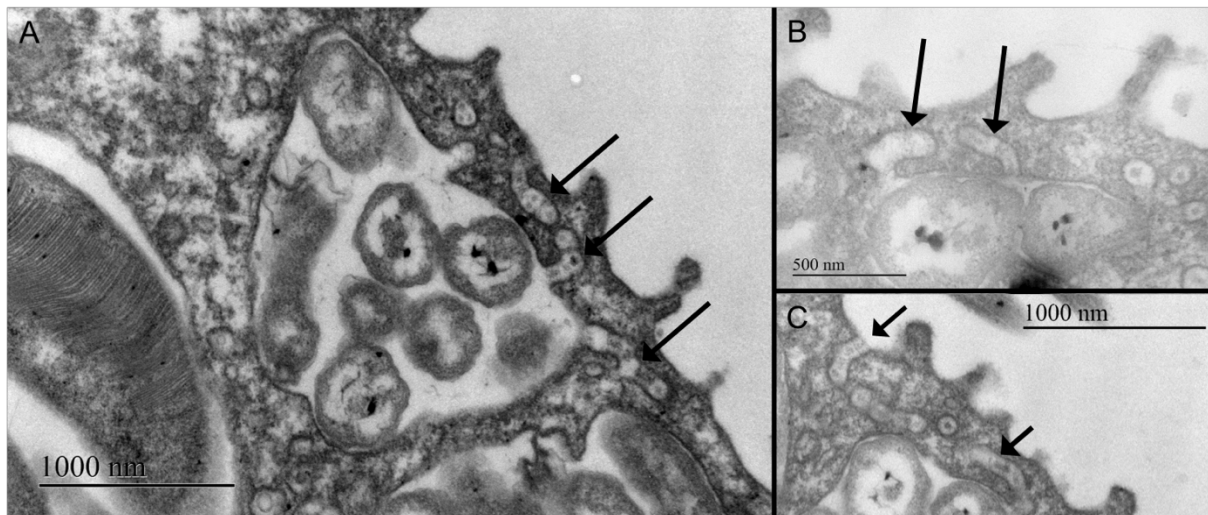


Figure 50 : Photo prise en microscopie électronique de bactériocytes de *Bathymodiolus azoricus* venant d'être remontée du site Menez Gwen. Les flèches montrent des possibles figures d'endocytose ou d'exocytose.

Dans ce chapitre, nous avons pu observer la multiplication des cellules de la branchie, ainsi que des symbiotes. Cette multiplication semble concentrée surtout dans la zone frontale des filaments branchiaux comprenant la zone ciliée et une partie de la zone des bactériocytes. Une zone de prolifération a également été observée dans la zone dorsale de la branchie. Le chapitre suivant porte sur l'identification des zones de mort cellulaire à l'intérieur de cette branchie, et les processus de relargage des symbiotes.

## 4 COMMENT DIMINUER LA QUANTITE DE SYMBIOTES ?

---

### 4.1 L'APOPTOSE DANS LES BRANCHIES DES BATHYMODIOLES

#### 4.1.1 Article: High rates of apoptosis visualized in the symbiont-bearing gills of deep-sea *Bathymodiolus* mussels

Des études du transcriptome chez plusieurs espèces du genre *Bathymodiolus* (*B. azoricus* ; *B. thermophilus* et *B. aff. boomerang*) entreprises à la station biologique de Roscoff ont montré une corrélation entre une haute charge en symbiotes et une sous expression des gènes qui inhibent l'apoptose (Boutet *et al.*, 2011; Guezi *et al.*, 2013). Comme nous l'avons vu dans la partie 1.1.5.2.1, l'apoptose est un type de mort cellulaire régulée qui joue un rôle clé dans le développement et l'homéostasie des organismes, et aussi dans leur système immunitaire (Kerr *et al.*, 1972; Hengartner, 2000; Elmore, 2007). Notre hypothèse est que l'apoptose pourrait être un moyen important de régulation de la quantité de symbiotes. Cette hypothèse est d'ailleurs reprise dans plusieurs articles (Guezi *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2017). Zheng va plus loin, en suggérant que l'apoptose pourrait se déclencher dans les bactériocytes les plus chargés en bactéries, comme un moyen d'en obtenir le carbone (Zheng *et al.*, 2017). Ces hypothèses basées sur une corrélation infèrent une causalité qui reste à démontrer. Dans ce volet du travail, nous avons donc souhaité visualiser la distribution de l'apoptose dans les branchies des bathymodioles. Pour ce faire nous avons utilisé la technique TUNEL (Transferase dUTP Nick End Labeling). Celle-ci se base sur la fixation d'un fluorochrome aux extrémités 3'OH libres de l'ADN clivé (Gavrieli *et al.*, 1992), il est ainsi possible de marquer le noyau des cellules apoptotiques et de les visualiser en microscopie à fluorescence. Il est donc possible de compter les cellules en apoptose et, à l'aide d'un simple marquage DAPI, le nombre total de noyaux. Le rapport entre le nombre de noyaux marqués par TUNEL et le nombre de noyaux totaux, exprimé en pourcentage, permet d'estimer le pourcentage d'apoptose dans une coupe de filament branchial. Lors d'expériences préliminaires réalisées en 2016, les images TUNEL dans les branchies de bathymodioles remontées sans maintien de la pression avaient révélé un nombre très important de cellules marquées, qui nous ont fait douter de l'état des cellules après la remontée depuis les profondeurs. Lors de la remontée des moules provenant de sites situés entre 800 et 3400m de profondeur, les tissus subissent un effet de dépressurisation plus ou moins importante suivant la profondeur du site. Durant cette thèse, notre première étape a été

d'observer et de mesurer l'effet potentiel que la remontée pourrait avoir sur le pourcentage de noyaux apoptotiques. Pour cela, des moules *Bathymodiolus azoricus* et *B. puteoserpentis* ont été prélevées sur 3 sites situés à 3 profondeurs différentes (voir partie 2.2.1.2 et 2.2.1.3) lors de deux campagnes (BIOBAZ et BICOSE), en utilisant deux méthodes pour la remontée : une remontée non isobare et une isobare. Les résultats indiquent que les niveaux d'apoptose ne sont pas significativement différents entre individus remontés avec et sans maintien de la pression du fond, et toujours nettement plus élevés que chez la moule côtière *Mytilus edulis* qui a été utilisée comme témoin. Nous pouvons en conclure que la grande quantité de marquage observée avec TUNEL n'est pas due à la dépressurisation subie par les moules. En conséquence, le fort taux d'apoptose correspond à un état physiologique réel.

Il semble donc que les cellules branchiales des moules des sources hydrothermales soient bien plus dynamiques que celle des moules côtières.

La méthode TUNEL a cependant suscité de nombreuses discussions quant à sa fiabilité pour marquer l'apoptose d'une cellule (Ansari *et al.*, 1993; Labat-Moleur *et al.*, 1998). D'ailleurs, un comité de spécialistes de la mort cellulaire programmée recommande de parler de marquage TUNEL, plutôt que d'apoptose (Kroemer *et al.*, 2009). Pour vérifier si le signal obtenu correspondait bien à de l'apoptose, une deuxième méthode a été utilisée : le marquage des cellules par un anticorps dirigé contre la forme active de la caspase-3, un effecteur-clé de l'apoptose. Le marquage de la caspase-3 active et le marquage TUNEL ont été réalisés sur des lames consécutives. Les zones où le signal TUNEL a été localisé correspondent aux zones de marquages intenses de la caspase 3 active. Nous pouvons en déduire que la caspase 3 localisé autour ou dans le noyau provoque la fragmentation de l'ADN donc l'apoptose. Ceci nous permet de nous fier au marquage TUNEL observé pour localiser l'apoptose dans les cellules des branchies.

Le pourcentage de cellules présentant un signal TUNEL a été mesuré dans les trois zones qui composent les filaments branchiaux des bathymodioles : (1) les boucles terminales des filaments branchiaux composées de cellules ciliées et de mucocytes, ainsi que les zones ciliées inter-filamentaire, regroupées ensemble ici sous le terme de « zones ciliées », (2) l'hémolymphe contenant les hémocytes, (3) la zone des bactériocytes contenant les symbiotes, encadrées de cellules intercalaires (Fiala-Médioni *et al.*, 1986). Nos résultats montrent que l'apoptose est plus fréquente dans les hémocytes et dans les zones ciliées, contrairement à la zone des bactériocytes qui présentent un pourcentage significativement plus faible.

Environ 50% des hémocytes de bathymodiales sont en apoptose. Ces hémocytes ont un rôle important dans le système immunitaire des mollusques, et les hémocytes de *Bathymodiolus* semblent avoir un rôle dans la détoxification (Fiala-Medioni, 1988; Terahara and Takahashia, 2008; Sokolova, 2009). Une hypothèse serait que la toxicité de l'environnement pourrait expliquer ce fort taux d'apoptose.

Dans la zone ciliée, 43% des cellules sont en apoptose. Ces cellules créent le courant d'eau qui traverse la branchie afin d'apporter les nutriments, les substrats aux bactéries, et l'oxygène aux cellules. Elles sont riches en mitochondries et très actives, en lien avec leur rôle moteur et la sécrétion de mucus. Dans la zone de bactériocytes, seulement 24% des cellules sont en apoptose. Cette zone est donc celle qui présente le moins de signal TUNEL. De plus, ce signal est majoritairement localisé dans la zone opposée à la terminaison ciliée externe, *i.e.* dans la zone où les bactériocytes possèdent peu voir pas de bactéries.

En complément, la localisation de l'apoptose dans les branchies d'une espèce des suintements froids, *Bathymodiolus aff. boomerang* du Golfe de Guinée du site Regab (env. -3000m) a été réalisée (mais aucune remontée isobare n'était disponible). L'apoptose a été localisée dans les mêmes zones branchiales avec des proportions relatives similaires à celles vues dans les moules hydrothermales, suggérant que les patrons observés sont typiques des grandes bathymodiales du genre *Bathymodiolus*.

Ce travail a permis de préciser la localisation et l'importance de l'apoptose dans les branchies des bathymodiales. Si celles-ci ont un taux élevé d'apoptose en comparaison de *Mytilus edulis*, les cellules en apoptose ne sont cependant pas celles qui contiennent le plus de bactéries, au contraire.

L'hypothèse, partagée par d'autres scientifiques (Zheng *et al.*, 2017), était qu'un bactériocyte possédant un nombre très important d'endosymbiotes aurait plus de chance d'être en apoptose, pour réguler directement la densité de ses symbiotes. Nos résultats montrent que contrairement à ce qui était attendu, l'apoptose dans la zone des bactériocytes touche essentiellement les cellules possédant peu voire pas de bactéries. Ces bactériocytes pauvres en bactéries sont proches du repli interne du « V » branchial (zone abfrontale) et donc éloignés de la zone ciliée. Ils ont donc moins accès aux substrats et aux bactéries environnementales. Dans cette zone branchiale, l'apoptose pourrait servir de recyclage des composants cellulaires des bactériocytes ne jouant plus leur rôle d'accueil de symbiotes ou étant en fin de vie.

La zone ciliée est la première zone en contact avec le milieu extérieur toxique que sont les fluides hydrothermaux. Les composés tels que les sulfures, le cuivre ou les métaux lourds

constituent des stress physiologiques. Par ailleurs, la forte activité des mitochondries pour produire l'énergie nécessaire à l'activité des cils pourrait en outre produire une abondance de ROS et donc un stress oxydatif important, mais dans ce cas, on aurait aussi un fort taux d'apoptose chez *Mytilus edulis*, ce qui n'est pas le cas. Les stress pourraient induire l'entrée en apoptose des cellules. L'apoptose participerait donc à la dynamique de la branchie contenant les symbiotes dans son ensemble plutôt qu'à la régulation directe du nombre de symbiotes présents.

Les résultats de ces travaux ont été présentés dans des congrès (voir partie 7.4) et sous la forme du manuscrit qui suit. Celui-ci a été soumis en février dans les Proceedings of the Royal Society B et refusé au mois de Juin. Nous préparons une nouvelle version, incluse ici, pour soumission prochaine au journal PloS One.



ARTICLE 1

# High rates of apoptosis visualized in the symbiont-bearing gills of deep-sea *Bathymodiolus* mussels

Piquet B.<sup>1,2</sup>, Shillito B.<sup>2</sup>, Lallier F.H.<sup>1</sup>, Duperron S.<sup>2,3,4</sup> and Andersen A.C.<sup>1</sup>

1: Sorbonne Université, CNRS, Lab. Adaptation et Diversité en Milieu Marin, AD2M, Team : Adaptation et Biologie des Invertébrés marins en Conditions Extrêmes, ABICE, Station Biologique de Roscoff, SBR, 29680 Roscoff, France.

2: Sorbonne Université, MNHN, CNRS, IRD, UCN, UA, Lab. Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques BOREA, Team : Adaptation aux Milieux Extrêmes, AMEX, 7 Quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

3: Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Lab. Mécanismes de Communication et Adaptation des Micro-organismes, Team : Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement, CCE, 12 rue Buffon, 75005 Paris, France.

4: Institut Universitaire de France, Paris, France.

Corresponding author: [andersen@sb-roscoff.fr](mailto:andersen@sb-roscoff.fr)

## Abstract

Symbiosis between *Bathymodiolus* and *Gammaproteobacteria* enables these deep-sea mussels to live in toxic environments like hydrothermal vents and cold seeps. The quantity of endosymbionts within the gill-bacteriocytes appears to vary according to the host's environment. We investigated the hypothesis of a control of the endosymbionts density by apoptosis, a programmed cell death. We used fluorometric TUNEL-method and active Caspase-3-targeting antibodies to visualize and quantify apoptotic cells in mussel gills. To avoid artefacts due to depressurisation upon specimen recovery from the deep-sea, we compared the apoptotic rates between mussels recovered unpressurised versus mussels recovered in a pressure-maintaining device, in two species from hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge: *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis*. Our results show that pressurized recovery had no significant effect on the apoptotic rate in the gill filaments. Apoptotic levels

were highest in the ciliated zones and in the circulating hemocytes, compared to the bacteriocyte zone. Apoptotic gill-cells in *B. aff. boomerang* from the pockmarks off the Gulf of Guinea, show similar distribution patterns. Deep-sea symbiotic mussels have much higher rates of apoptosis in their gills than the non-symbiotic coastal mussel *Mytilus edulis*. We discuss how apoptosis might be one of the mechanisms that contribute to the adaptation of deep-sea mussels to toxic environments and/or to symbiosis.

Key words: symbiosis, isobaric recovery, hydrothermal vents, cold seeps, *Mytilus edulis*, bacteriocytes.

## Introduction

Symbiosis is of major significance to life on Earth. Because symbiosis is a mixture of cooperation and conflict between two (or several) partners, each of them must initiate and carry on a continued dialogue and control their partners' interaction. Many symbioses involve partners from different domains of life, such as a eukaryote host and a bacterial symbiont. This questions how a reciprocal control can occur between so distantly related organisms, and whether some of the mechanisms involved might be universal. One of the mechanisms by which an animal host can control populations of its symbionts is apoptosis. Apoptosis is a programmed cell death involving three main steps: (1) nuclear condensation and fragmentation, (2) cell-wall budding into apoptotic bodies, and (3) their release and possible phagocytosis by neighboring cells (Kerr *et al.*, 1972; Häcker, 2000). Apoptosis plays multiple roles in normal cell turnover, during development, and in the immune system (Elmore, 2007). Its role in symbiosis is also documented: in the cereal weevil *Sitophilus* for example, apoptosis participates to regulate the densities of the endosymbiotic bacterium *Sodalis pierantonius*. The symbiont provides essential amino acids that allow the host to rapidly build its protective exoskeleton. Endosymbionts multiply in young adults, but when the cuticle is built, the symbionts are rapidly eliminated by apoptosis, and the bacterium material is recycled by autophagy (*i.e.* intracellular digestion by lysosomes) (Vigneron *et al.*, 2014). In corals, bleaching occurs in response to heat stress, when the host releases dinoflagellate symbionts through autophagy and apoptosis linked in a see-saw manner, such that when apoptosis is inhibited autophagy is initiated as a back-up mechanism, and vice-versa (Dunn *et al.*, 2007). In addition apoptosis might act as a post-phagocytic winnowing mechanism in the symbiotic system (Dunn and Weis, 2009).

At deep-sea hydrothermal vents and cold seeps, the animals that dominate in terms of biomass live in association with chemosynthetic bacteria, which sustain most of their nutrition (Fisher *et al.*, 1987; Sibuet and Olu, 1998; Duperron, 2010; Duperron *et al.*, 2016), but the role apoptosis could play in regulating symbiosis has barely been explored. In the vestimentiferan tubeworms *Riftia pachyptila*, living at vents, and *Lamellibrachia luymeri* from cold seeps, the sulphur-oxidising symbionts are located within cells of the trophosome. These cells differentiate and proliferate from the trophosome lobule center, then migrate towards the periphery of the lobule where they undergo apoptosis (Pflugfelder *et al.*, 2009). Ultrastructural observations at the periphery of the trophosome lobules show that the symbionts are digested in autophagic vacuoles leading to extensive myelin bodies, then remnants of symbionts disappear, while apoptotic nuclei with clumped chromatin patches occur (Pflugfelder *et al.*,

2009). Thus, in *Riftia* as in the weevil, apoptosis appears to precede autophagy, while in corals apoptosis might follow autophagy. These examples illustrate how tight apoptosis and autophagy can be intertwined in the process of symbiont regulation. Whether apoptosis precedes or follows autophagy, their coordination ensures that the symbiont is eliminated avoiding tissue inflammation, and that the cellular material of the bacteriocyte is recycled (within the initial symbiotic cell) to recover the metabolic investment from the symbiotic phase.

Deep-sea mussels house very dense populations of endosymbionts inside specialized gill epithelial cells, the bacteriocytes, (Fiala-Médioni *et al.*, 1986; Lorion *et al.*, 2013). In fact, *Bathymodiulus* constitute by far the densest microbial habitats, although they usually host a very limited diversity of symbiont lineages (Duperron, 2010; Duperron *et al.*, 2016). The relevance to the topic of symbiont control lies in the fact that the association is particularly flexible, with abundances of their symbionts (Sulfur- and/or methane-oxidizers) that can vary within hours depending on the availability of symbiont substrates in the surrounding water (Kádár *et al.*, 2005; Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008; Guezi *et al.*, 2014; Szafranski *et al.*, 2015; Duperron *et al.*, 2016). The symbionts also rapidly disappear if their substrates are absent (Guezi *et al.*, 2014; Kádár *et al.*, 2005; Riou *et al.*, 2010). Ultrastructural studies of the gill cells have indicated intracellular digestion of the symbionts within lysosomes as an important carbon transfer mechanism (Fiala-Medioni *et al.*, 1994; Streams *et al.*, 1997; Barry *et al.*, 2002) suggesting that the host can access the energy stored in its symbionts by killing and digesting them (*i.e.* a process compared to “farming”). Enzymatic studies involving the detection of acid phosphatases have shown that some energy from the symbionts can also be transferred to the host through molecules leaking from live symbionts (*i.e.* a process compared to “milking”) (Kádár *et al.*, 2008). The farming process clearly corresponds to autophagy, although autophagy might not be the unique process involved in the control between host and symbionts. Recent results from whole-gill tissue transcriptomic analyses in the vent species *Bathymodiulus thermophilus* indicated that high symbiont loads are correlated with under-expression of the genes inhibiting apoptosis, suggesting that when the symbionts are abundant, apoptosis might be activated (Boutet *et al.*, 2011; Guezi *et al.*, 2013). It can thus be hypothesized that apoptosis is a mechanism by which the hosts control the number of symbionts inside their gills, and possibly obtain their carbon as it could be linked to the known autophagy process. High throughput sequencing and transcriptomic analyses have shown the great importance of the apoptotic signaling pathways in the gill tissue of several species of *Bathymodiulus* (Bettencourt *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2017).

Apoptosis in mollusks is generally triggered by the interaction between immune cells and parasites or pathogens (Sokolova, 2009). The high degree of evolutionary conservation of biochemical signaling and executing pathways of apoptosis indicate that programmed cell death likely plays a crucial role in homeostasis and functioning of molluscan immune system (Sokolova, 2009; Kiss, 2010; Romero *et al.*, 2015). Apoptosis is particularly complex in mollusks, and caspases are key molecules that are activated in two major apoptotic pathways: the extrinsic or death receptor pathway, and the intrinsic or mitochondrial pathway (Romero *et al.*, 2015). The executioner caspase-3 activates a heterodimer protein, the DNA fragmentation factor that is responsible for the completion of DNA fragmentation (Romero *et al.*, 2015). However alternative caspase-independent pathways have also been evidenced in mollusks, and cross-talk between different pathways might also be involved (Kiss, 2010; Romero *et al.*, 2015). Apoptosis was shown to be induced in *Bathymodiolus azoricus* in response to *Vibrio diabolicus* exposure (Barros *et al.*, 2016). However the immune gene responses in *B. azoricus* appeared tied to the presence of endosymbiont bacteria, as the progressive weakening of host transcriptional activity correlates with the gradual disappearance of endosymbiont bacteria from the gill tissues during the extended acclimatization in the sulfide and methane-free aquaria (Barros *et al.*, 2016). Thus, the presence of symbionts might modulate the apoptotic patterns in deep-sea symbiotic mussels compared to their coastal non-symbiotic relatives.

While several studies have highlighted an important activity of apoptotic signaling factors in three species of *Bathymodiolus* (*B. azoricus*, *B. manusensis* from hydrothermal vents, and *B. platifrons* from cold seeps (Bettencourt *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2017)), transcriptomic studies do not give a visual account of this apoptotic activity within the tissues. The present study is the first microscopic investigation of the general distribution patterns of apoptotic cells in the gills, and the first attempt to quantify apoptosis in the different gill cell types of *Bathymodiolus*. We chose to focus on three species, namely *Bathymodiolus azoricus*, *B. puteoserpentis* and *B. aff. boomerang*. The first two often dominate the macrofauna at Mid-Atlantic Ridge (MAR) hydrothermal vent sites (Cosel *et al.*, 1994, 1999). The third occurs at cold seeps located on the continental margin in the Gulf of Guinea (Olu-Le Roy *et al.*, 2007). The former two species are phylogenetically sister species and are also closely related to *B. boomerang* (Lorion *et al.*, 2013). All three species harbor methane- and sulfur-oxidizing bacteria that co-exist within host cells. Their gills comprise several cell types: epidermal ciliated cells and mucous goblet cells, bacteriocytes hosting the symbionts, interspaced by intercalary cells, and finally circulating hemocytes (Fiala-Médioni *et al.*, 2002). Our aim was to investigate

whether apoptosis might contribute to regulating symbiont densities. We thus tested whether apoptosis preferentially occurs in bacteriocytes, in particular the most densely populated ones. As the recovery of deep-sea specimens from several thousand meters depth usually involves a depressurization stress that might alter gene expression and disturb the cell machinery, leading to artefacts (Pradillon and Gaill, 2007; Pradillon, 2012) we performed a comparative analysis of apoptosis in specimens recovered with and without depressurization upon collection. Specimens of *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* were recovered using an hyperbaric chamber (PERISCOP - Projet d'Enceinte de Remontée Isobare Servant la Capture d'Organismes Profonds) that allows maintaining their native pressure and temperature throughout recovery, avoiding recovery bias (Shillito *et al.*, 2008). Control specimens recovered without PERISCOP were included. The cold seep *B. aff. boomerang* was analyzed to identify potential seep versus vent habitat-related differences, and *Mytilus edulis* was used as a non-symbiont-bearing control mussel. Apoptosis was visualized in gill tissue sections by the TUNEL method (Transferase dUTP Nick-End Labeling) (Gavrieli *et al.*, 1992; Pflugfelder *et al.*, 2009; Elisabeth *et al.*, 2012), a common and standard way of visualizing the fragmented DNA in the nucleus of cells undergoing apoptosis. To further support that observed patterns actually correspond to apoptosis, we performed immunolocalization of active Caspase-3, a form of this enzyme that is the overall convergent node of molecular cascades leading to irreversible apoptosis in mollusks (Romero *et al.*, 2015). Altogether, this study provides to our knowledge the first overview of apoptosis in relation to symbiosis in chemosynthetic mussels.

## Materials and Methods

### *Specimen collection*

This analysis was conducted on 40 individuals of *Bathymodiolus* (Bivalvia, Mytilidae) consisting in 21 *Bathymodiolus azoricus* and ten *B. puteoserpentis* from hydrothermal vents, and nine *B. aff. boomerang* from cold seeps. Specimens of *B. azoricus* were collected during the BioBaz 2013 cruise on the Mid-Atlantic Ridge (Lallier, 2013): ten specimens were sampled from the vent fields of Menez Gwen (MG2 marker: 37°50.669N; 31°31.156W, 830m depth) and eleven specimens from Rainbow site (France 5 marker: 37°17.349N; 32°16.536W, at 2270m depth). *B. puteoserpentis* were sampled during the BICOSE 2014 cruise (Cambon-Bonavita, 2014). All ten specimens were sampled on the vent site Snake Pit, close to the “Elan” marker (23°22'54"N, 44°55'48"W, at 3520m depth). For these two species, half of the specimens were recovered in a standard (*i.e.* unpressurized) way, and the other half using the

PERISCOP hyperbaric vessel. The standard collection was done in a waterproof sealed box (BIOBOX) containing local deep-sea water, in which the mussels were exposed to a depressurization corresponding to the depth of their habitat during recovery (approx. 0.1MPa every 10m). The pressurized recovery was performed using a small device named the "CROCO" sampling cell (Ravaux *et al.*, 2013), which was transferred into the PERISCOP pressure-maintaining device (Shillito *et al.*, 2008). PERISCOP was released from the seafloor through a shuttle system and surfaced within 45 to 100 minutes. Pressure was monitored during ascent with an autonomous pressure sensor (SP2T4000, NKE Instruments, France). To compare apoptosis between vent and seep mussels, nine specimens of *Bathymodiolus* aff. *boomerang* were collected in a standard manner from the Régab pockmark site in the Gulf of Guinea (M1 marker 5°47.89S, 9°42.62E, 3150 m depth and M2 marker 5°47.85S, 9°42.67E, 3150 m depth) during the 2011 cruise WACS (Olu, 2011). All three cruises were aboard the RV *Pourquoi Pas?* using the ROV *Victor 6000*. In addition to deep-sea mussels, nine coastal mussels (*Mytilus edulis*) were either bought from the fishmongers or collected on rocks from the intertidal seashore in front of Roscoff marine station. All data concerning the specimens are shown in the Supplementary Table 1.

#### *Sample fixation, inclusion and FISH experiments*

Mussel gills were dissected at 4°C, within 10 minutes after recovery (releasing pressure of the PERISCOP in the case of isobaric recoveries). Maximum shell length, height under the umbo, and width of the closed shell were measured with a caliper (see supplementary figure 1). Anterior and posterior gill fragments were fixed in 4% formaldehyde in sterile-filtered seawater (SFS) for 2 hours. Gills were then rinsed in SFS, and dehydrated in increasing series of ethanol (50, 70 and 80%, 15 min each). In the laboratory, gills were embedded in polyethylene glycol (PEG) distearate: 1-hexadecanol (9:1), cut into 8 µm-thick sections using a microtome (Thermo, Germany), recovered on SuperFrost Plus slides (VWR International, USA), and stored at -20°C. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments were performed to confirm the localization of symbionts following the protocol and using probes described previously (Szafranski *et al.*, 2015). The gill lamellae were sectioned ventrally, so that each filament appeared in cross-section with its frontal end facing externally towards mantle and shell, and its abfrontal end facing the inner gill lamellae towards the foot. (See supplementary figure 2).

### *TUNEL (Transferase dUTP Nick-End Labeling)*

For the detection and quantification of apoptosis, we used the TUNEL method with the *in-situ* cell death detection kit following manufacturer's instructions (ROCHE, Germany). All slides were first dewaxed then rehydrated by immersion in decreasing series of ethanol. Tissues were rinsed with PBS 1 X and permeabilised by proteinase K ( $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) to enable the binding of dUTP. Various incubation times were tested, and 8 min gave the best result. Slides were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1h30 with fluorophore dUTP and enzyme rTdT. Slides were rinsed in 3 PBS bathes (10min each) to remove the unfixed fluorescein-12-dUTP. In a last step, DNA of all nuclei was labeled with 4'6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) that is incorporated in the SlowFade® Gold Antifade Mounting reagent (Invitrogen, USA). For each analyzed individual, positive and negative controls were performed on adjacent serial sections. The positive control involved a pre-incubation with DNase I (3U/ml, 10min) before running the full protocol. It provokes artificial fragmentation of DNA and exposes 3'OH ends, which bind the green fluorochrome and leads to all nuclei being labelled. The negative control follows the same protocol, but omitting the rTdT enzyme. It enables to reveal autofluorescence of the tissues and unspecific fixation of the fluorophore.

### *Immunolocalisation of active Caspase-3*

Slides were dewaxed and rehydrated as for the TUNEL experiments. They were then covered in blocking solution (PBS 10X, 2% BSA, 0.3% triton) for 2h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Tissue sections were incubated with the rabbit polyclonal active anti-Caspase-3 primary antibody (directed against a peptide from the P17 fragment of the activated human/mouse Caspase-3) (R&D system, USA). This primary incubation lasted 2 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ . Slides were rinsed in PBS 10X three times and covered with the secondary antibody: Alexa Fluor 488-labelled goat anti-rabbit (Invitrogen, dilution 1:500) for 1 h at room temperature. After 3 baths in PBS 10X, slides were mounted with SlowFade®. Negative controls were obtained by omitting the primary antibody.

### *Image acquisition and analysis*

Slides were observed under a BX61 epifluorescence microscope (Olympus, Japan), and pictures were taken under an SP5 confocal (Leica, Germany) at the x40 magnification. This magnification enabled a clear resolution to count each individual labelled nucleus. Entire cross-sections of the TUNEL-labelled gill filaments were covered in full in about 3 to 4 pictures (See Fig 1 and 2). The exposure time (or gain on the confocal) was standardized and identical for all pictures. The 3D-acquisitions were obtained by acquiring images every  $0.5\ \mu\text{m}$  throughout the



thickness of the section. Slides were observed at 505nm and 555nm wavelengths (TUNEL and Caspase 3 signals, respectively), and 400 nm (DAPI).

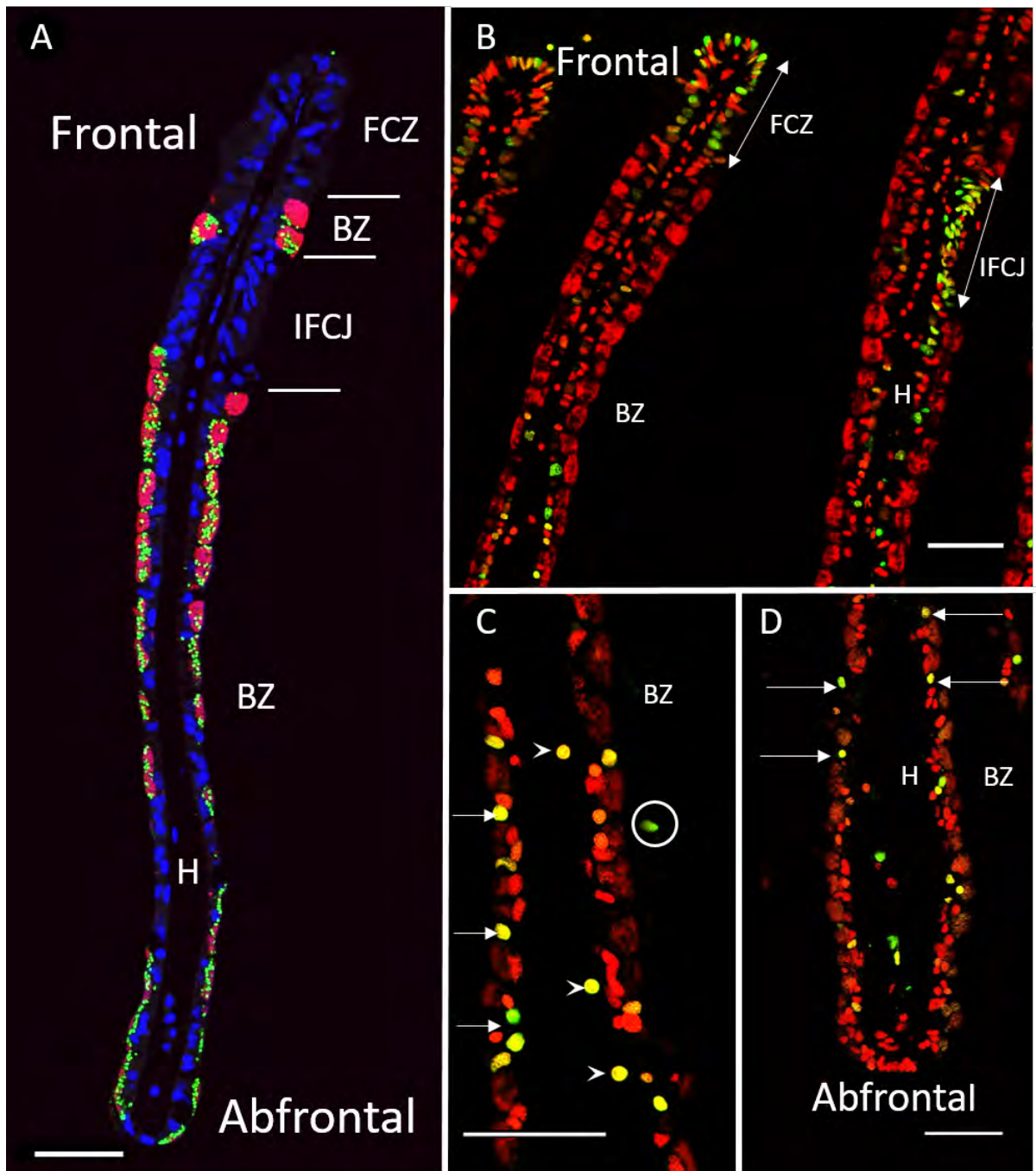
Images were analyzed by counting the labelled nuclei using the free Image J software (Abràmoff *et al.*, 2004). However care was taken to count separately each respective cell-type: hemocytes, ciliated cells and finally bacteriocytes and intercalary cells (the two latter being close neighboring cell types, hard to distinguish under the fluorescence microscope, they were counted together) (figure 1 and 2). Thus for each image, percentages of TUNEL-labelled nuclei were obtained from the hemolymph zone (HZ), the ciliated zone (CZ), and the bacteriocyte zone (BZ) by calculating the ratio between the number of TUNEL-labelled nuclei and the number of DAPI-labelled nuclei present in each respective zone. A fourth value, the total percentage for the whole picture, was obtained by summing all labelled nuclei (whatever their cell-type) on the total number of DAPI-stained nuclei in a given picture.

#### *Comparisons between species, zones and treatments*

The percentage of TUNEL nuclei labelled was used for all analyses after an Arcsine transformation (Duperron *et al.*, 2011). The normality of datasets was tested (Shapiro-Wilk test), which revealed a non-normal distribution of the data. Non-parametric tests were thus applied for inter-groups comparisons (Mann–Whitney–Wilcoxon and Kruskal–Wallis) with the Bonferroni correction for multiple comparisons. All statistical analyses and graph plots were performed using R (R Development Core Team, version 3.3.3).

## **Results**

All analyses were performed on transversal sections of the gill lamellae (supplementary figure 2). From the FISH results, it is noteworthy that bacteriocytes close to the frontal ciliated zone contained large quantities of endosymbionts, and that both the height of the bacteriocytes and their symbiont density decreased towards the abfrontal zone in *B. puteoserpentis*, and *B. azoricus* (figure 1A).

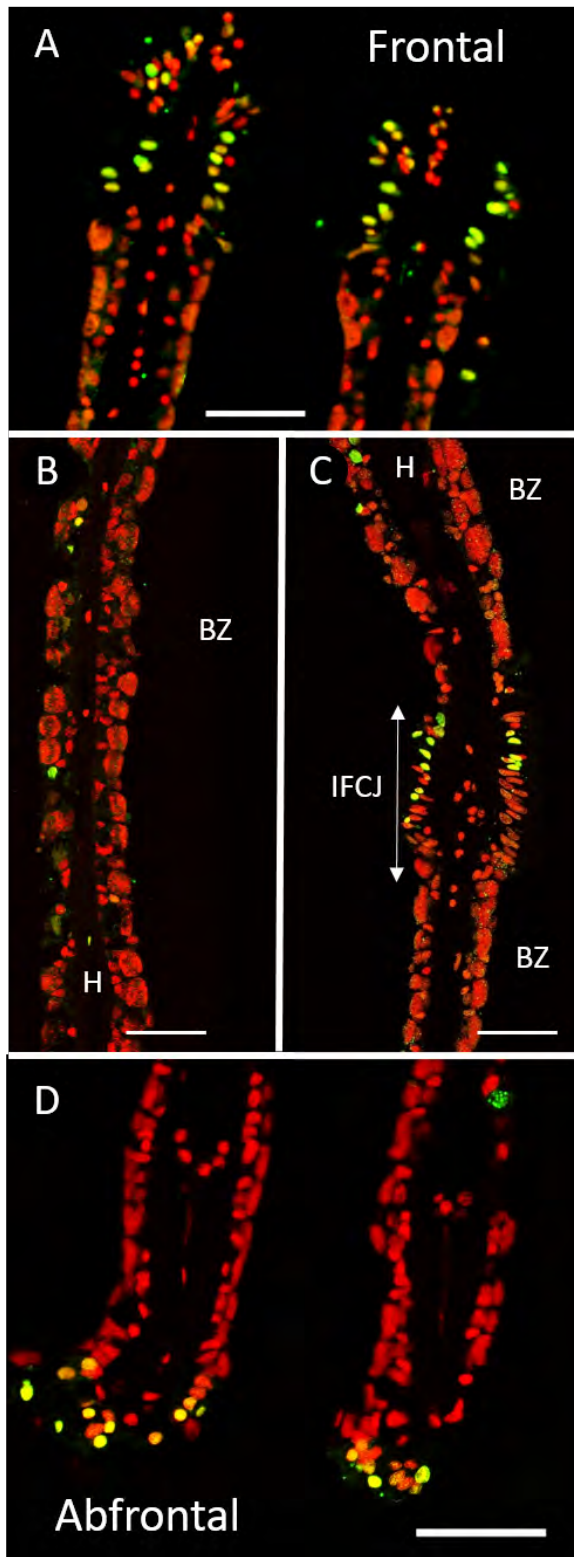


**Figure 1: FISH and TUNEL labelling on gill filaments of *B. azoricus*.** A: Transverse section of gill filaments with FISH labelling. Nuclei from host tissue in blue (DAPI); sulfur-oxidizing symbionts in pink, and methane-oxidizers in green. B, C and D TUNEL-labelled nuclei in green, DAPI staining in red. Arrows point to apoptotic nuclei. B: Ciliated zones often contain many labelled nuclei. C: Bacteriocyte zone that displays many apoptotic nuclei (arrows), apoptotic hemocytes (arrowheads) and a apoptotic cell detached from the basal lamina (circle). D: Abfrontal zone of the gill filament showing apoptotic nuclei in cells with no symbiont (arrows), and apoptotic cells detached from the basal lamina (circles). Abbreviations: BZ: Bacteriocyte zone; FCZ: Frontal Ciliated Zone; H: Haemolymph zone; IFCJ: Inter-Filamentary Ciliated Junction. Scale bars: 50 µm.

### *Visualization of apoptosis in Bathymodiolus*

The distribution of TUNEL positive cells in *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* are shown in Fig. 1 and 2, respectively. In negative controls (supplementary figure 3B), no fluorescence at all was observed compared to positive controls (supplementary figure 3A), except a bright autofluorescence signal seen in clustered round granules. These granules are thought to correspond to mucus droplets present in goblet-cells interspersed among the ciliated cells and along the epithelium of the gill filaments. This autofluorescence signal was easy to distinguish from TUNEL signal, as the latter was typically much smaller and brighter.

Nuclei labelled in the TUNEL experiments were more or less bright. As TUNEL labels the free 3'OH fragments, we assume that the strongly labelled nuclei showed a higher amount of DNA fragments compared to the weakly stained ones. Since apoptosis is a progressive process occurring within a few hours, we hypothesize that the former were in a more advanced apoptotic state. Both weak and strong-labelled nuclei were thus counted together to estimate the percentage of apoptotic nuclei in the various cell-types of the gill lamellae (ciliated zone, bacteriocyte zone and hemolymph) (figure 1 and 2).



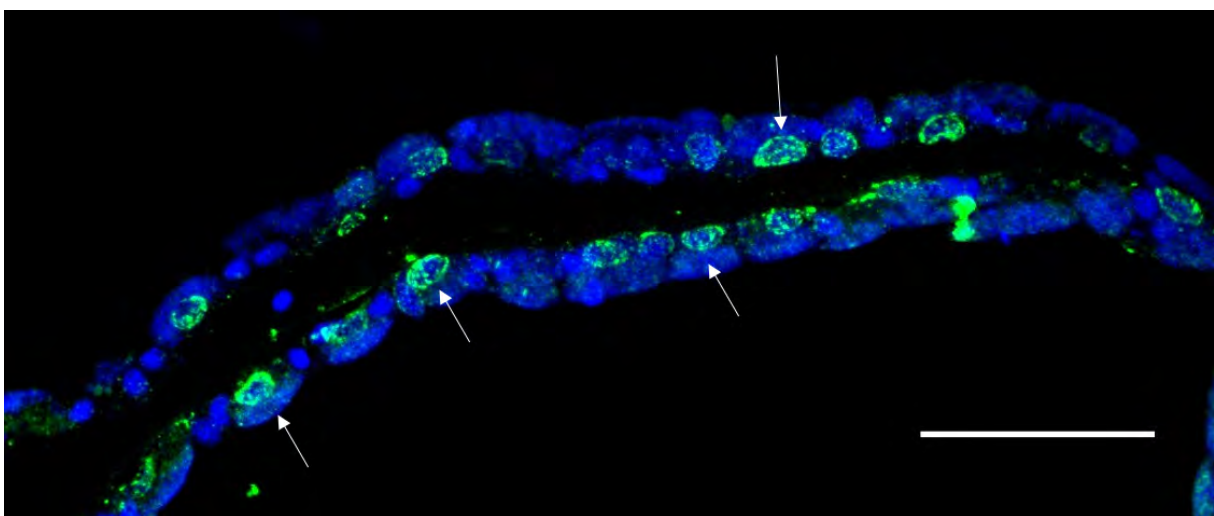
**Figure 2: TUNEL labelling on gill filaments of *B. puteoserpentis*.** TUNEL-labelled nuclei in green, DAPI staining in red. A: Frontal ciliated zones often contain many labelled nuclei. B: Bacteriocyte zone that displays only a few apoptotic nuclei. C: Inter Filamentary ciliated Junction often contains many labelled nuclei. D: Abfrontal zone of the gill filament with apoptotic nuclei. Abbreviations: BZ:

Bacteriocyte zone; FCZ: Frontal Ciliated Zone; H: Hemolymph zone; IFCJ Inter-Filamentary Ciliated Junction. Scale bars: 50 $\mu$ m.

The ciliated frontal zone often is the brightest labelled zone with many strongly labelled cells: up to one cell out of two in some filaments (Fig. 1B, 2A) giving a clustered appearance of the apoptotic cells in the frontal ciliated zone. However the closest neighbor filament may sometimes only have a few or no labelled cells at all, indicating a great spatial variability in the tissue taken all together.

Hemocytes were present on all images, but in varying numbers. Many hemocytes are visible on figure 1C for example, compared to figure 1B, but more of them were labelled in the latter. TUNEL-labelling in the bacteriocyte zone was heterogeneous: very few nuclei were labelled close to the frontal ciliated zone (figure 1B and figure 2A), and then increasingly more were labelled when reaching the abfrontal zone (figure 1D and figure 2D). In the abfrontal zone, the bacteriocytes were most of the time devoid of bacteria. Sometimes, a bacteriocyte seemed to be lacking in the abfrontal zone, leaving a “hole” in the epithelial tissue (figure 1C-D and figure 2 B-D).

Active Caspase 3 immunohistochemistry assays yielded strong signals within the cytoplasm of cells, and particularly concentrated around the nuclei (figure 3). On serial sections within the same individual, the distribution patterns of active Caspase-3 were similar to the TUNEL signal observed, confirming that TUNEL actually revealed apoptotic cells. In general, the active Caspase-3 antibody seemed to label more nuclei than TUNEL.



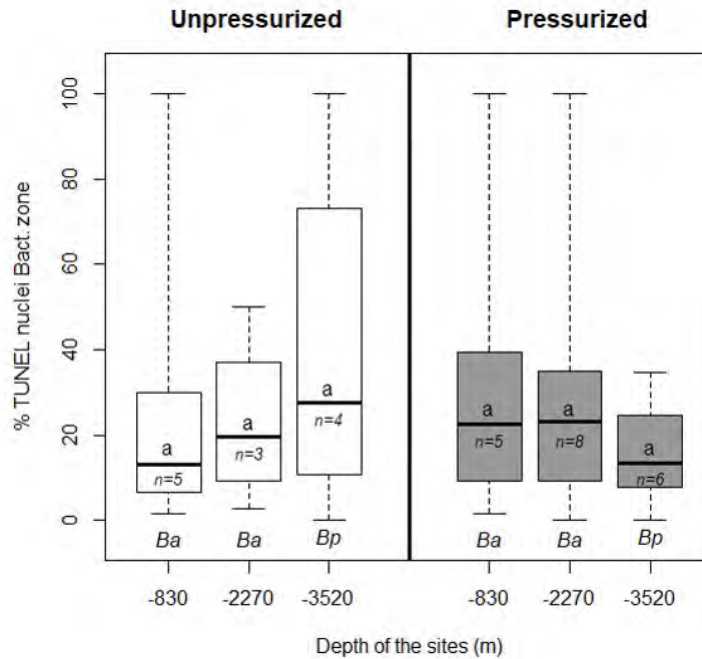
**Figure 3: Active Caspase-3 labelling in the gill of *B. azoricus*.** Typical labelling in green surrounds the nucleus (arrows). DAPI signal in blue. Scale bar: 50 $\mu$ m.

*Patterns of apoptosis in Bathymodiolus azoricus and B. puteoserpentis*

In total, 31 individuals from the two species were analyzed, representing a total of 19.612 DAPI-labelled nuclei counted on 206 images. The specimens came from deep-sea sites located at different depths, namely Menez Gwen (-830m), Rainbow (-2270m) and Snake Pit (-3520m). Sampled specimens were either recovered unpressurised (non-isobaric) or with a pressurized (isobaric) recovery. In the latter, PERISCOP reached the surface while retaining 83.6, 76.5 and 70.4% of the native deep-sea pressure at the Menez Gwen, Rainbow and Snake Pit sites, respectively.

First of all, comparing the global counts in gills of all individuals from all three sites, we noted that there is a great variation in the percentage of apoptotic nuclei among individuals (see supplementary figure 4 A-C). This strong heterogeneity indicates that results of statistical analyses must be treated with caution.

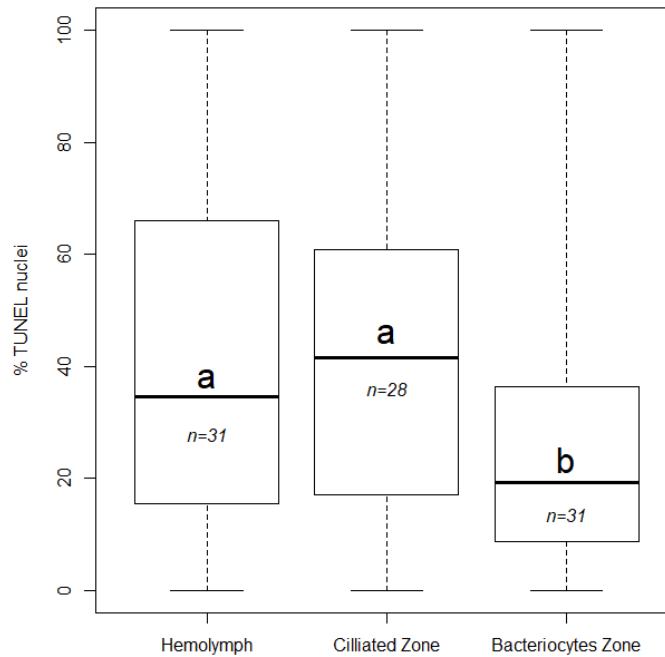
In the ciliated (CZ) and bacteriocyte zones (BZ), the percentage of TUNEL-labelled nuclei was not significantly different among the three MAR sites and the two recovery types (CZ: Kruskal-Wallis test chi-squared = 6.07, df = 5, p-value = 0.30; BZ: Kruskal-Wallis test chi-squared = 3.69, df = 5, p-value = 0.60) (See figure 4 for BZ and supplementary figure 5 A for CZ). Similarly, the hemolymph zone showed no significant difference among sites and recovery types (HZ: Kruskal-Wallis test chi-squared = 10.74, df = 5, p-value = 0.05678) (supplementary figure 5 B).



**Figure 4: Percentages of apoptotic nuclei in the bacteriocyte zone of *B. azoricus* (Ba) and *B. puteoserpentis* (Bp) from the three sites.** White boxplots indicate specimens from non-isobaric, and grey from isobaric recoveries, respectively. Percentages were not significantly different (a) in pairwise Wilcoxon test with Bonferroni's standard correction. The letter *n* indicates the number of individuals analyzed for each species. Boxplot whiskers correspond to minimal and maximal values on a single image, the line inside the box is the median, and the upper and lower frames of the boxes represent the first and third quartile respectively.

These quantitative results confirm the visual patterns and intensities of TUNEL-labelling in gill filaments of mussels that did not reveal any self-evident difference between specimens from the three sites in either recovery type.

For all specimens put together, quantifications indicated median values of 41.3% ( $\pm 27\%$ ) and 34.5% ( $\pm 31\%$ ) labelled nuclei in the ciliated and hemolymph zones, respectively. In comparison, the bacteriocyte zone displayed only 19.3% ( $\pm 24\%$ ) of nuclei that were labelled, (figure 5) which is significantly less than in the other two (Kruskal-Wallis test chi-squared = 27.639,  $df = 2$ ,  $p\text{-value} < 0.001$ , post-hoc test with Bonferroni correction between HZ and BZ,  $p\text{-value} = 0.0002$ ; between CZ and BZ,  $p\text{-value} < 0.0001$ ).



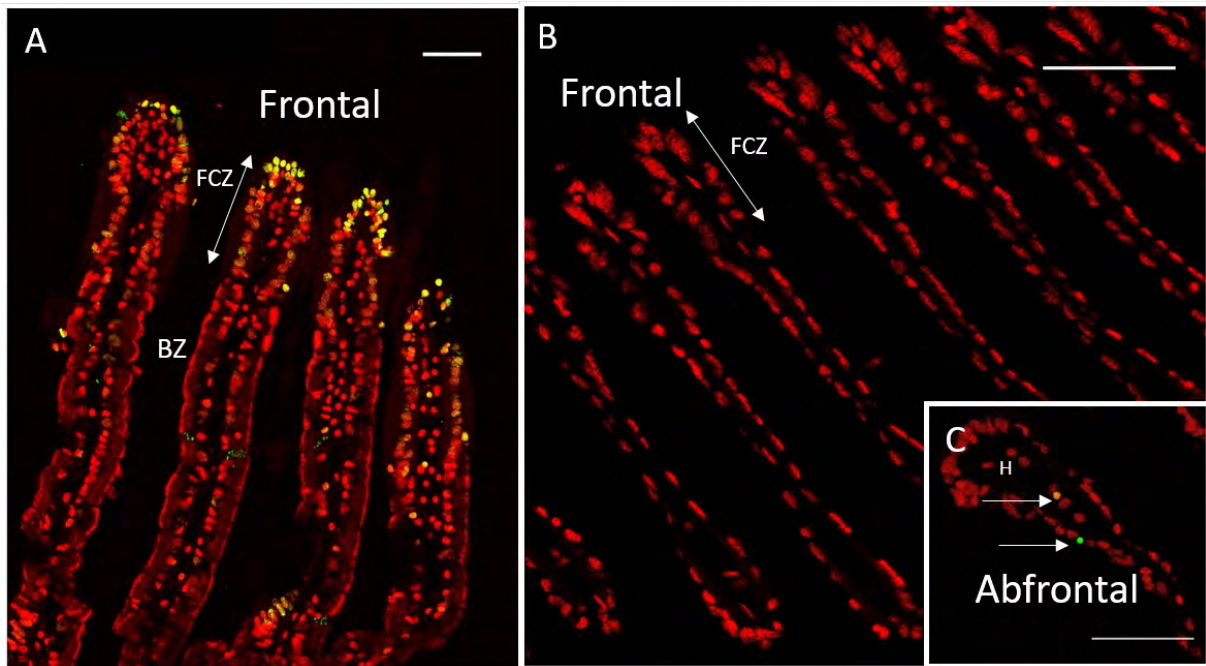
**Figure 5: Percentages of apoptotic nuclei in the hemolymph, ciliated and bacteriocyte zones of *B. azoricus* and *B. puteoserpentis*.** Different letters (a,b) indicate the plots that are statistically different (Wilcoxon test) and n indicates the number of specimens. Boxplot whiskers indicate minimal and maximal values on a single image, the line inside the box is the median, and the upper and lower frames of the boxes represent the first and third quartile respectively.

#### *Patterns of apoptosis in the seep species Bathymodiolus aff. boomerang*

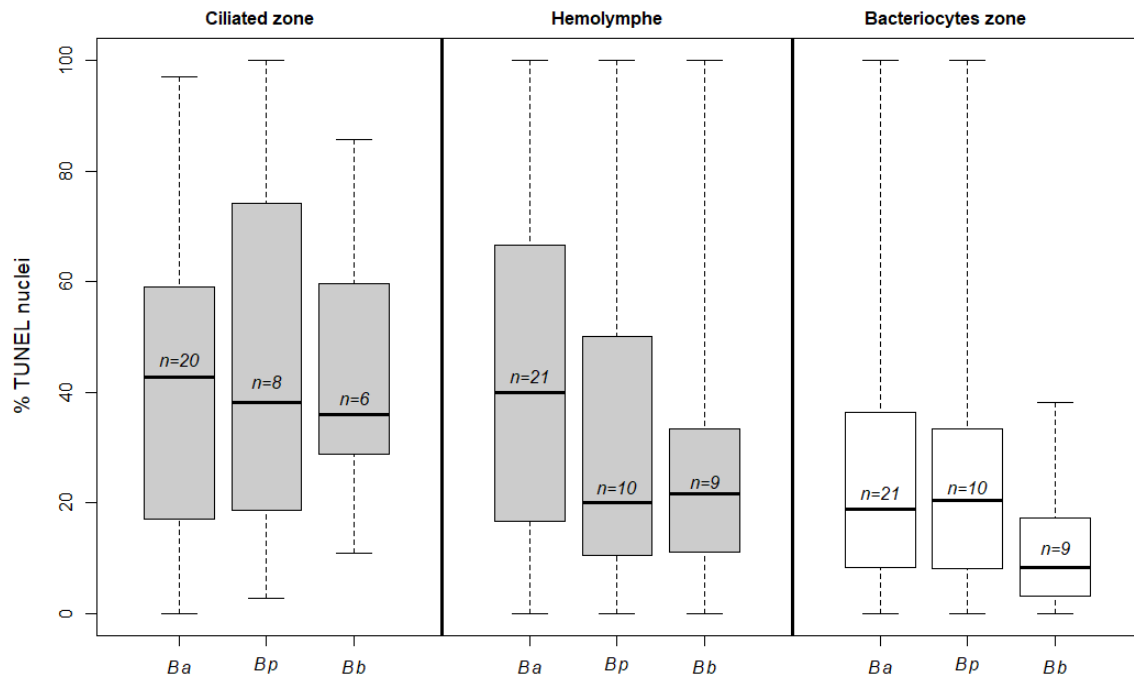
TUNEL labelling was applied to the gill filaments of *Bathymodiolus* aff. *boomerang* 9 specimens, 40 pictures representing 3,424 nuclei) (figure 6 A). Percentages were significantly different between zones (Kruskal-wallis test: chi-squared = 25.00, df = 2, p-value < 0.0001). As in the two studied vent species, apoptosis was more frequent in the ciliated zone (median: 36%,  $\pm 23\%$ ) and then in the hemocytes zone (median: 21%  $\pm 9\%$ ), compared to the bacteriocyte zone (median: 9%  $\pm 23\%$ ). Overall these results suggest similar patterns in Mytilidae from hydrothermal vents and cold seeps (figure 7).

Visually, the density of bacteria inside bacteriocytes seems to be more constant between bacteriocytes located in the frontal and in the abfrontal distal edge in *B. aff. boomerang* compared to the two vent mussels.





**Figure 6: TUNEL labelling on gill filaments of *Bathymodiolus* aff. *boomerang* (A) and *Mytilus edulis* (B-C).** TUNEL-labelling in green or yellow, DAPI staining in red. A: *Bathymodiolus* aff. *boomerang* displays many labelled nuclei mostly in the frontal ciliated zone. B-C: *Mytilus edulis* gills show very few TUNEL-labelled nuclei, two are visible in the insert (C). Same abbreviations as in figure 1. Scale bar: 50µm.



**Figure 7: Percentages of apoptotic nuclei compared between vent and seep species in the ciliated, haemolymph and bacteriocyte zones of *B. azoricus*, *B. puteoserpentis* and *B. aff. boomerang* (Ba, Bp and Bb, respectively).** The letter *n* indicates the number of specimens. Boxplot whiskers indicate minimal and maximal values on a single image, line inside the box is the median, the line inside the box is the median, and the upper and lower frames of the boxes represent the first and third quartile respectively.

#### *Patterns of apoptosis in the gill of coastal non-symbiotic Mytilus edulis*

Gill tissues of *Mytilus edulis* were labelled by the TUNEL method (9 specimens, 28 images, 4.091 nuclei). The number of labelled nuclei was very low in comparison to vent and seep mussels (figure 6B) (median: 1.6%,  $\pm$  1.6%). In *M. edulis*, the majority of labelled nuclei were hemocytes (median: 6.9%,  $\pm$  10.9%) compared to the epidermal cells (median: 0.9%,  $\pm$  1.4%).

## **Discussion**

#### *Relevance of TUNEL labelling to the study of apoptosis in deep-sea mussels*

During apoptosis DNA undergoes fragmentation, and the TUNEL assay labels the free 3'OH ends that are generated. However, other mechanisms can lead to DNA fragmentation that would result in a positive TUNEL labelling, and for this reason the TUNEL methodology has been criticized (de Torres *et al.*, 1997; Labat-Moleur *et al.*, 1998; Kroemer *et al.*, 2009). It is nevertheless a standard procedure that has already been applied in mollusc tissues, and in association with active caspase-3 immunolocalisation to detect apoptosis in the chemosymbiotic bivalve *Codakia orbiculata* (Elisabeth *et al.*, 2012; Motta *et al.*, 2013). Caspase-3 exists within the cytosol as inactive dimers. All apoptotic pathways in mollusks converge towards a step of cleavage of this zymogen that ultimately results in the triggering of apoptosis (Boatright and Salvesen, 2003; Romero *et al.*, 2015). Although it may have other roles, the activation of Caspase-3 usually leads to cell death by apoptosis. Because other caspases activate necrosis and necroptosis pathways, the occurrence of active Caspase-3 signals rather supports that most observed TUNEL signals actually correspond to apoptotic nuclei (Yuan *et al.*, 2016). It should however be kept in mind that apoptosis can take place without Caspase-3 (Abraham and Shaham, 2004; Chipuk and Green, 2005).

#### *Deep-sea mussels display high rates of apoptosis in their gills*

Recovery stress has long been cited as a factor that may prevent accurate assessment of the physiology of deep-sea organisms (Childress *et al.*, 1978; Shillito *et al.*, 2008, 2014). In this study, we found no statistical difference between percentages of apoptotic cells between gills

from specimens of *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* recovered classically (non-isobaric) and those recovered using the isobaric sampling cell PERISCOP. Thus depressurization during recovery does not seem to trigger massive apoptosis in the gills, despite that depressurization, by disrupting cells, may alter the distribution of different actors of apoptosis that pass through different cell compartments (mitochondria, nucleus, cell membrane) (Shillito *et al.*, 2008). No differences were observed between hydrothermal vent sites, whatever their depth, further suggesting that apoptosis is a natural phenomenon in the gills of deep-sea mussels. Estimates of rates of apoptosis based on TUNEL labelling were much higher in the gills of deep-sea mussels including the seep species *B. aff. boomerang*, compared to their coastal and non-symbiotic relative *Mytilus edulis*. At this stage it is not possible to ascertain whether the much higher levels measured in *Bathymodiolus* are linked with their deep-sea chemosynthetic habitats (for example due to the abundance of xenobiotic compounds and oxidative stressors), with the occurrence of symbionts, or with their different evolutionary history.

#### *Patterns and potential roles of apoptosis in deep-sea mussels*

A major finding in this study is that rates of apoptosis vary considerably among individual specimens. This could reveal distinct physiological status among them at the time of the analysis. Nonetheless, it should be underlined that apoptosis is known to be a rapidly occurring mechanism, in a time range of only a few hours (Kerr *et al.*, 1972). The distribution of apoptotic cells in a tissue often shows a clustered pattern, as for instance in the mammalian intestine, where apoptotic signal appears typically confined to a cluster of neighboring villi, while other areas of the mucosa appear unstained (Gavrieli *et al.*, 1992). A sporadic distribution might ensure a local recycling of the organ, without harming its global function, and might indeed be a characteristic of the apoptotic phenomenon. In the case of *Bathymodiolus*, gills often showed a few TUNEL-positive cells in some cross-sections, and even clusters in the frontal ciliated area of some filaments, but none in the frontal zone of neighboring filaments. This clustered pattern may also contribute to the observed heterogeneity among our individuals. Anyway, the great inter-individual variation prevents from drawing any definitive conclusion, even based on statistical tests of which the results have to be treated with caution. Nevertheless, a clear trend is that the rates measured in the bacteriocyte zone are lower than in the ciliated and hemocyte zones.

The very high rates of apoptosis in the ciliated gill cells, in particular compared to *M. edulis*, are intriguing because these cells do not contain symbionts. The gills of *Bathymodiolus* are clearly different from those of the coastal mussels for which, at any given size, the gill surface area is around 20 times smaller (Duperron *et al.*, 2016). *Bathymodiolus* gills are particularly thick and over-developed, which might lead to a higher metabolic demand in order to properly circulate water and vital compounds. Ciliated cells also display very abundant mitochondria (Fiala-Médioni *et al.*, 1986; Fiala-Medioni, 1988; Duperron *et al.*, 2016). One hypothesis could thus be that the great metabolic activity and numerous mitochondria produce large amounts of Reactive Oxygen Species (ROS), resulting in oxidative stress that may lead to increased apoptosis (Mone *et al.*, 2014). A possible adaptation would be to increase the turnover rates of the ciliated cells. To achieve this, high rates of cell proliferation could be expected, and this has to be tested. Another hypothesis is linked with fluid toxicity and the direction of water flow in the gills. Ciliated cells are indeed the first exposed to the surrounding fluid, and thus exposed to the highest levels of reduced compounds including toxic sulfur and various metals that possibly trigger apoptosis (Circu and Aw, 2010). This may also explain why symbionts tend to be more abundant in the bacteriocytes that are close to the regions that are more exposed to their substrates (mainly methane and sulfide), since these compounds might be more easily accessible to symbionts first in the frontal zone compared to the abfrontal zone, sustaining bacterial growth. Among deleterious compounds, copper ions were for example recently hypothesized to cause cell apoptosis in *Bathymodiolus azoricus*. Cadmium was shown to cause apoptosis on isolated *Crassostrea gigas* hemocytes after 24h *in vitro* incubation in the range of 10-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Sokolova, 2004). Gills of mussels are known to accumulate metals, and *Bathymodiolus azoricus* exposed to cadmium display antioxidant enzymatic activities that may be partly due to the endosymbionts. These could contribute to protect bacteriocytes, but not the symbiont-free ciliated cells, resulting in higher apoptosis rates in the latter (Company *et al.*, 2004). *In vivo* incubation experiments at *in situ* pressure would be necessary to test these oxidative stress and fluid toxicity hypotheses.

Apoptosis of circulating and resident hemocytes have a high baseline level in mollusks (Sokolova, 2009), and we estimated that 34.5 % of the hemocytes were apoptotic in *B. azoricus* and *B. puteoserpentis*. The immune system of mussels relies on innate immunity only, and hemocytes play a key role in the immune response. They are also suspected to have a role in detoxification (Fiala-Medioni, 1988). In *Crassostrea virginica*, the most common apoptotic cell type is the hemocyte. The apoptotic index for *Crassostrea* hemocytes, calculated the same way

as herein, but using another visualization method (Apoptag), ranges between 23 and 99% with a mean of 46% (Sunila and LaBanca, 2003). In another study, *Crassostrea virginica* displayed between 4.5% and 15.3% of apoptotic circulating hemocytes (Annexin-V assay) (Goedken *et al.*, 2005). These results are congruent with the rates observed in this study, and could reveal overall high apoptosis rates in the hemocytes of bivalves, visually confirming the importance of apoptosis in the innate immune system.

Despite the fact that apoptosis rates are high in *Bathymodiolus* bacteriocytes compared to those in *M. edulis* epithelial gill-cells, they are only roughly half of those measured in ciliated cells and hemocytes. Results from transcriptomic studies and their subsequent interpretation by other authors led to the hypothesis that apoptosis was the main mechanism that allowed mussels (initially *Bathymodiolus thermophilus*) to control the amount of symbionts in their gills. The underlying idea was that bacteria-filled bacteriocytes would undergo apoptosis in a way similar to that observed in the tubeworm *Riftia pachyptila*, in which this mechanism participates to the recovery of symbionts carbon, and recycling of the animal cells (Pflugfelder *et al.*, 2009). On the contrary, our observations show that the bacteriocytes that contain only a few to no bacteria at all are those that enter into apoptosis. Lower levels of apoptosis in bacteriocytes, in particular in those where symbionts are the most abundant, could be explained by the bacterial production of anti-apoptotic compounds. This could explain why cells with fewer bacteria, mostly located in the distal (*i.e.* abfrontal) edge away from the ciliated zone and possibly most depleted in symbiont substrates, would preferentially enter apoptosis, although this is merely hypothetical at this stage. In bacteriocytes near the ciliated zone, bacteria are most probably digested (Fiala-Medioni *et al.*, 1994; Kádár *et al.*, 2008; Détrée *et al.*, 2016), *i.e.* eliminated by autophagy.

Overall, it appears that high rates of apoptosis are a normal feature in deep-sea mussel gills physiology. Rather than being a direct mechanism used to kill the most bacteria-rich cells in order to gain carbon, apoptosis seems to be involved in the overall dynamics of the gill organ itself. Indeed, observed patterns indicate that the cells harboring few to no bacteria are more often apoptotic. This can be interpreted in the light of gill specialization to symbiosis, with over-developed gills requiring stronger cilia activity, which possibly leads to higher turnover of ciliated cells, and habitat characteristics including the presence of toxic compounds. Apoptosis mechanisms are known to play major roles in other symbioses (Foster and McFall-Ngai, 1998; Dunn *et al.*, 2007; Pflugfelder *et al.*, 2009; Vigneron *et al.*, 2014). For example

*Codakia orbiculata*, a shallow water bivalve that hosts *Gammaproteobacteria* in its gills can lose and reacquire symbionts. After loss of the symbionts, the bacteriocytes multiply massively to reacquire bacteria, while the cells in excess are eliminated by apoptosis (Elisabeth *et al.*, 2012). A similar mechanism may be occurring in mussels. At first, apoptosis could appear as a heavy cost for the host, especially given that it may endanger the whole organ. However, neighboring cells could phagocytose the cells that undergo apoptosis, allowing recycling of their constituents. Apoptotic cells also tend to detach from the basal lamina, and once detached they may be treated as food particles by the mussels, again allowing recycling. The correlation observed in previous transcriptome analyses (Guezi *et al.*, 2013) between apoptotic rates and overall symbiont content may then be indirect: hosts with more bacteria tend to have larger gills (Duperron *et al.*, 2016), and thus more active ciliated cells, so overall more cells in apoptosis. High rates of apoptosis should thus be regarded as an integral part of the adaptation of deep-sea mussels to their symbioses and their habitats, and visualization pattern indicates that apoptosis probably plays more complex roles than previously assumed. This study has only investigated adult specimens but because mussels acquire their symbionts in their post-larval stage and throughout the host lifetime (Wentrup *et al.*, 2013, 2014), the coupling of symbiont acquisition with apoptosis should be explored at all developmental stages. Further study should also investigate the impact of stress (toxic compounds, temperature) on the rates of apoptosis, as well as cell proliferation patterns. Because of the relative simplicity of the mussel holobiont, its high bacterial load and high levels of apoptosis, deep-sea mussels may prove useful models to further investigate the links between apoptosis, autophagy and symbiosis.

### **Acknowledgments:**

We thank the captain and crew on board the Research Vessel “*Pourquoi pas?*” and the ROV “*Victor 6000*” (Ifremer) for their invaluable contributions to this work. A special thanks to chief scientists Dr. Karine Olu (WACS 2011), Pr. François Lallier (BioBaz 2013) and Dr. Marie-Anne Cambon-Bonavita and Dr. Magali Zbinden (BICOSE 2014). We are indebted to Dr. Kamil Szafranski for his help with the deep-sea mussels *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* recovered on board during the BICOSE and BioBaz cruises. We are grateful to Antoine Mangin, Myriam Lebon and Marie Louvigné for their technical assistance as undergraduate students in the lab. This research was supported by Institut Universitaire de France project ACSYMB, Université Pierre et Marie Curie and ARED Région Bretagne project FlexSyBi (contract number 9127, grant to BP), BALIST program (ANR-08-BLAN-0252), EU projects

EXOCET/D (FP6-GOCE-CT-2003-505342), MIDAS (FP7/2007-2013, grant agreement n° 603418) and CNRS and IFREMER for cruise funding. We are grateful to the microscopy platform Merimage (Roscoff, France) partner core facilities and to the Institute of Biology Paris-Seine Imaging Facility, supported by the “Conseil Regional Ile-de France”, CNRS and Sorbonne Université.

### **Author’s contribution:**

B. P. did the histology work, the microscopy imaging, the statistical analyses and wrote a first version of the paper. B.S. performed the isobaric mussel collections with the PERISCOP pressure-maintaining device during the two cruises (BioBaz 2013 and BICOSE 2014). F.L. enabled the collections of deep-sea mussel during the BioBaz 2013 cruise. S.D fixed the mussels during the WACS 2011 and BioBaz 2013 cruises and supervised BP’s analyses in the AMEX-team in Paris. A.A. fixed the *M. edulis* and contributed to BP’s histology work in the ABICE-team in Roscoff. S.D. and A.A. are the collaborative designers of the study. S.D., A.A. and B.P. wrote the latest version of the paper, all authors have read and corrected its final draft.

## References:

- Abraham MC, Shaham S. 2004. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biology* **14**: 184–193.
- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11**: 36–42.
- Barros I, Mendes S, Rosa D, Serrão Santos R, Bettencourt R. 2016. *Vibrio diabolicus* immunomodulatory effects on *Bathymodiolus azoricus* during long-term acclimatization at atmospheric pressure. *Journal of Aquaculture Research & Development* **7**.
- Barry JP, Buck KR, Kochevar RK, Nelson DC, Fujiwara Y, Goffredi SK, Hashimoto J. 2002. Methane-based symbiosis in a mussel, *Bathymodiolus platifrons*, from cold seeps in Sagami Bay, Japan. *Invertebrate Biology* **121**: 47–54.
- Bettencourt R, Pinheiro M, Egas C, Gomes P, Afonso M, Shank T, Santos R. 2010. High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *BMC Genomics* **11**: 559.
- Boatright KM, Salvesen GS. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* **15**: 725–731.
- Boutet I, Ripp R, Lecompte O, Dossat C, Corre E, Tanguy A, Lallier FH. 2011. Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* **12**: 1–13.

- Cambon-Bonavita M-A. 2014. BICOSE cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Childress JJ, Barnes AT, Quetin LB, Robison BH. 1978. Thermally protecting cod ends for the recovery of living deep-sea animals. *Deep Sea Research* **25**: 419–422.
- Chipuk JE, Green DR. 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**: 268–275.
- Circu ML, Aw TY. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **48**: 749–762.
- Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B, Fiala-Médioni A. 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Environmental Research* **58**: 377–381.
- Cosel R von, Métivier B, Hashimoto J. 1994. Three new species of *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents in the Lau Basin and the north Fiji Basin, western Pacific, and the Snake Pit area, Mid-Atlantic Ridge. *The Veliger* **37**: 374–392.
- Cosel R von, Comtet T, Krylova EM. 1999. *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *The Veliger* **42**: 218–248.
- Détrée C, Chabenat A, Lallier FH, Satoh N, Shoguchi E, Tanguy A, Mary J. 2016. Multiple I-type lysozymes in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and their role in symbiotic plasticity. *PLOS ONE* **11**: 1–19.
- Dunn SR, Weis VM. 2009. Apoptosis as a post-phagocytic winnowing mechanism in a coral-dinoflagellate mutualism. *Environmental Microbiology* **11**: 268–276.
- Dunn SR, Schnitzler CE, Weis VM. 2007. Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellate symbiont release during cnidarian bleaching: every which way you lose. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 3079–3085.
- Duperron S. 2010. The diversity of deep-sea mussels and their bacterial symbioses. In *The vent and seep biota*, Kiel S (ed). Springer: Dordrecht; 137–167.
- 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: Variability of symbiont abundances in a seep mussel. *Geobiology* **9**: 481–491.
- Duperron S, Quiles A, Szafranski KM, Léger N, Shillito B. 2016. Estimating symbiont abundances and gill surface areas in specimens of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus puteoserpentis* maintained in pressure vessels. *Frontiers in Marine Science* **3**: 1–12.
- Elisabeth NH, Gustave SDD, Gros O. 2012. Cell proliferation and apoptosis in gill filaments of the lucinid *Codakia orbiculata* (Montagu, 1808) (Mollusca: Bivalvia) during bacterial decolonization and recolonization. *Microscopy Research and Technique* **75**: 1136–1146.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**: 495–516.
- Fiala-Medioni A. 1988. Synthèse sur les adaptations structurales liées à la nutrition des mollusques bivalves des sources hydrothermales profondes. *Oceanologica acta N°SP*: 173–179.

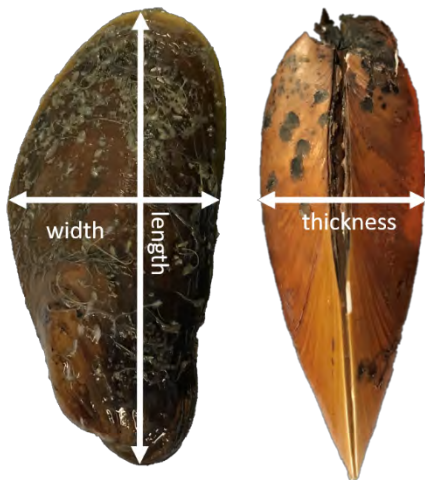


- Fiala-Médioni A, Métivier C, Herry A, Le Pennec M. 1986. Ultrastructure of the gill of the hydrothermal-vent mytilid *Bathymodiolus* sp. *Marine Biology* **92**: 65–72.
- Fiala-Medioni A, Michalski J-C, Jollès J, Alonso C, Montreuil J. 1994. Lysosomic and lysozyme activities in the gill of bivalves from deep hydrothermal vents. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **317**: 239–244.
- Fiala-Médioni A, McKiness Z, Dando P, Boulegue J, Mariotti A, Alayse-Danet A, Robinson J, Cavanaugh C. 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. *Marine Biology* **141**: 1035–1043.
- Fisher CR, Childress JJ, Oremland RS, Bidigare RR. 1987. The importance of methane and thiosulfate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Marine Biology* **96**: 59–71.
- Foster JS, McFall-Ngai MJ. 1998. Induction of apoptosis by cooperative bacteria in the morphogenesis of host epithelial tissues. *Development genes and evolution* **208**: 295–303.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* **119**: 493–501.
- Goedken M, Morsey B, Sunila I, Dungan C, De Guise S. 2005. The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and perkinsus marinus. *Journal of Shellfish Research* **24**: 177–183.
- Guezi H, Boutet I, Tanguy A, Lallier FH. 2013. The potential implication of apoptosis in the control of chemosynthetic symbionts in *Bathymodiolus thermophilus*. *Fish & Shellfish Immunology* **34**: 1709.
- Guezi H, Boutet I, Andersen AC, Lallier FH, Tanguy A. 2014. Comparative analysis of symbiont ratios and gene expression in natural populations of two *Bathymodiolus* mussel species. *Symbiosis* **63**: 19–29.
- Häcker G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* **301**: 5–17.
- 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*. *The ISME Journal* **2**: 284–292.
- 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*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **318**: 99–110.
- Kádár E, Davis SA, Lobo-da-Cunha A. 2008. Cytoenzymatic investigation of intracellular digestion in the symbiont-bearing hydrothermal bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Biology* **153**: 995–1004.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**: 239–257.
- Kiss T. 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* **15**: 313–321.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, et al. 2009. Classification of cell death:

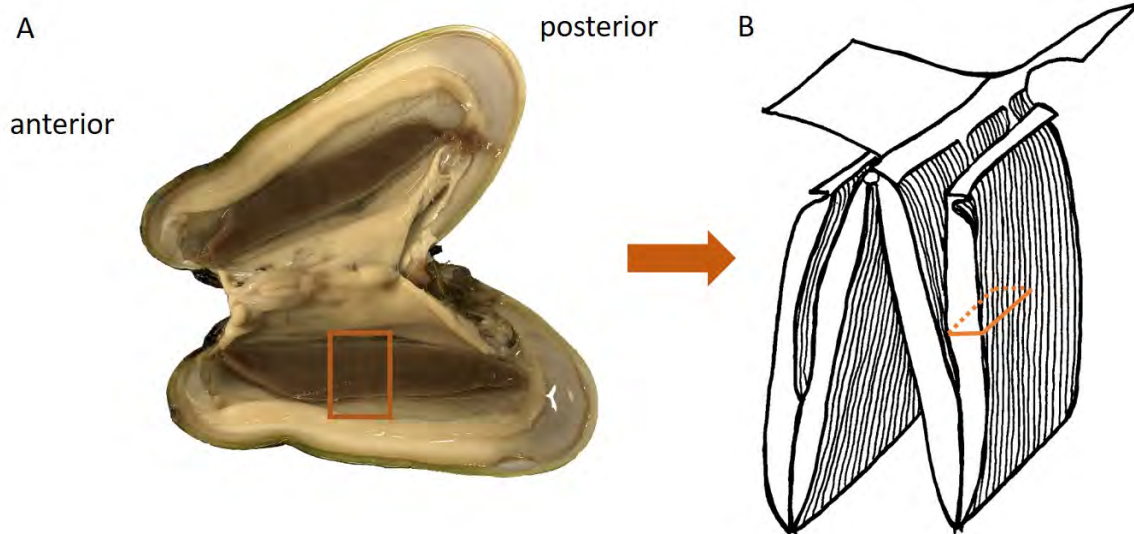
- recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation* **16**: 3–11.
- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. 1998. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **46**: 327–334.
- Lallier F. 2013. BIOBAZ 2013 cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Le Pennec M, Hily A. 1984. Anatomie, structure et ultrastructure de la branchie d'un Mytilidae des sites hydrothermaux du pacifique oriental. *Oceanologica acta* **7**: 517–523.
- Lorion J, Kiel S, Faure B, Kawato M, Ho SYW, Marshall B, Tsuchida S, Miyazaki J-I, Fujiwara Y. 2013. Adaptive radiation of chemosymbiotic deep-sea mussels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20131243–20131243.
- Mone Y, Monnin D, Kremer N. 2014. The oxidative environment: a mediator of interspecies communication that drives symbiosis evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**: 20133112–20133112.
- Motta CM, Frezza V, Simoniello P. 2013. Caspase 3 in molluscan tissues: Localization and possible function. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **319**: 548–559.
- Olu K. 2011. WACS cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Olu-Le Roy K, Cosel R von, Hourdez S, Carney SL, Jollivet D. 2007. Amphi-Atlantic cold-seep *Bathymodiolus* species complexes across the equatorial belt. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **54**: 1890–1911.
- Pflugfelder B, Cary SC, Bright M. 2009. Dynamics of cell proliferation and apoptosis reflect different life strategies in hydrothermal vent and cold seep vestimentiferan tubeworms. *Cell and Tissue Research* **337**: 149–165.
- Pradillon F. 2012. High hydrostatic pressure environments. In *Life at extremes: environments, organisms and strategies for survival*, Bell EM (ed). CABI: Wallingford; 271–295.
- Pradillon F, Gaill F. 2007. Pressure and life: some biological strategies. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **6**: 181–195.
- Ravaux J, Hamel G, Zbinden M, Tasiemski AA, Boutet I, Léger N, Tanguy A, Jollivet D, Shillito B. 2013. Thermal limit for metazoan life in question: *In vivo* heat tolerance of the pompeii worm (N Nikolaidis, Ed). *PLoS ONE* **8**: e64074.
- Riou V, Halary S, Duperron S, Bouillon S, Elskens M, Bettencourt R, Santos RS, Dehairs F, Colaço A. 2008. Influence of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>S availability on symbiont distribution, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences* **5**: 1681–1691.
- Riou V, Colaço A, Bouillon S, Khripounoff A, Dando P, Mangion P, Chevalier E, Korntheuer M, Santos R, Dehairs F. 2010. Mixotrophy in the deep sea: a dual endosymbiotic hydrothermal mytilid assimilates dissolved and particulate organic matter. *Marine Ecology Progress Series* **405**: 187–201.

- Romero A, Novoa B, Figueras A. 2015. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish & Shellfish Immunology* **46**: 79–87.
- Shillito B, Hamel G, Duchi C, Cottin D, Sarrazin J, Sarradin P-M, Ravaux J, Gaill F. 2008. Live capture of megafauna from 2300m depth, using a newly designed Pressurized Recovery Device. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **55**: 881–889.
- Shillito B, Gaill F, Ravaux J. 2014. The IPOCAMP pressure incubator for deep-sea fauna. *J. Mar. Sci. Technol.* **22**: 97–102.
- Sibuet M, Olu K. 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep Sea Research Part II* **45**: 517–567.
- Sokolova IM. 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *Journal of Experimental Biology* **207**: 3369–3380.
- Sokolova IM. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal* **6**: 49–58.
- Streams ME, Fisher CR, Fiala-Medioni A. 1997. Methanotrophic symbiont location and fate of carbon incorporated from methane in a hydrocarbon seep mussel. *Marine Biology* **129**: 465–476.
- Sunila I, LaBanca J. 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**: 163–170.
- Szafranski KM, Piquet B, Shillito B, Lallier FH, Duperron S. 2015. Relative abundances of methane- and sulfur-oxidizing symbionts in gills of the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* under pressure. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **101**: 7–13.
- de Torres C, Munell F, Ferrer I, Reventos J, Macaya A. 1997. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neuroscience Letters* **230**: 1–4.
- Vigneron A, Masson F, Vallier A, Balmand S, Rey M, Vincent-Monégat C, Aksoy E, Aubailly-Giraud E, Zaidman-Rémy A, Heddi A. 2014. Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. *Current Biology* **24**: 2267–2273.
- 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. *The ISME journal* **7**: 1244–1247.
- Wentrup C, Wendeberg A, Schimak M, Borowski C, Dubilier N. 2014. Forever competent: deep-sea bivalves are colonized by their chemosynthetic symbionts throughout their lifetime: Symbiont colonization in gills of deep-sea bivalves. *Environmental Microbiology* **16**: 3699–3713.
- Wong YH, Sun J, He LS, Chen LG, Qiu J-W, Qian P-Y. 2015. High-throughput transcriptome sequencing of the cold seep mussel *Bathymodiolus platifrons*. *Scientific Reports* **5**: 16597.
- Yuan J, Najafov A, Py BF. 2016. Roles of Caspases in Necrotic Cell Death. *Cell* **167**: 1693–1704.
- Zheng P, Wang M, Li C, Sun X, Wang X, Sun Y, Sun S. 2017. Insights into deep-sea adaptations and host-symbiont interactions: a comparative transcriptome study on *Bathymodiolus* mussels and their coastal relatives. *Molecular Ecology*: 5133–5148.

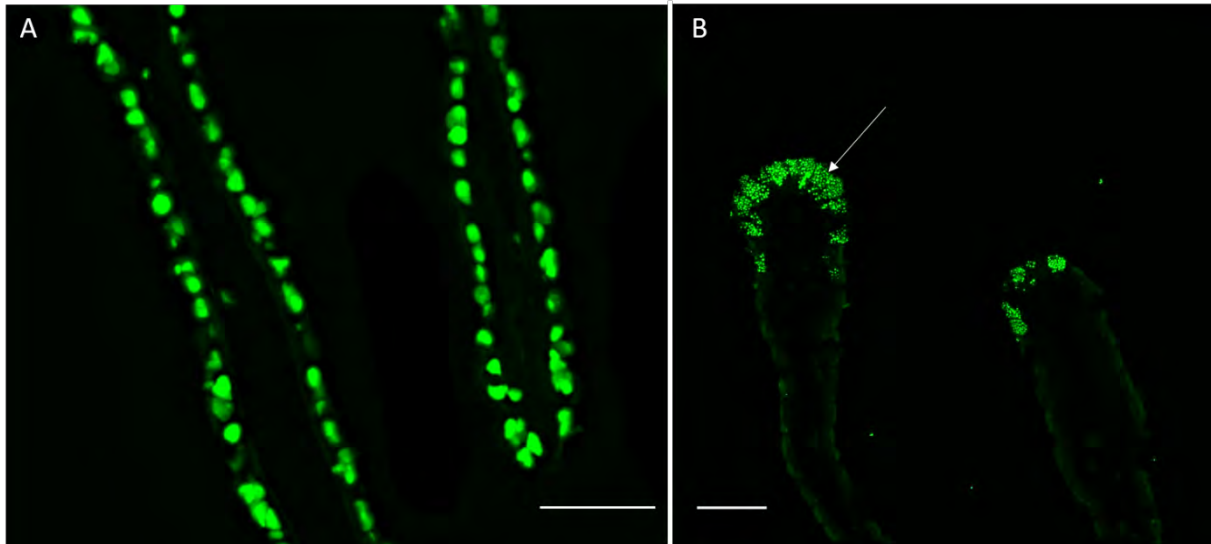
Supplementary Figures and Table



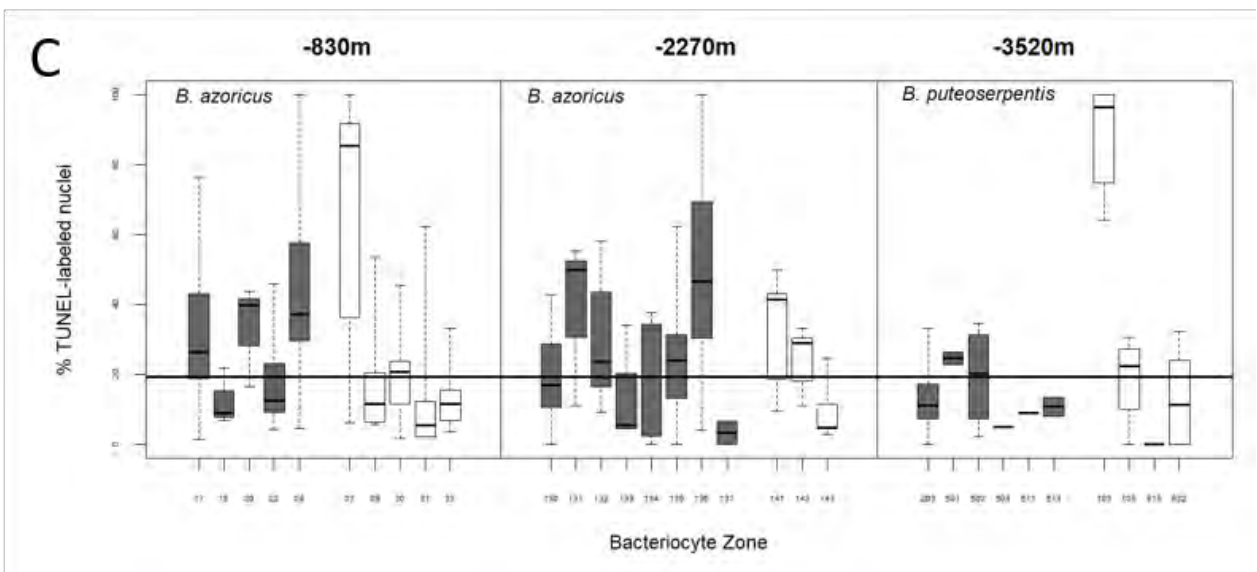
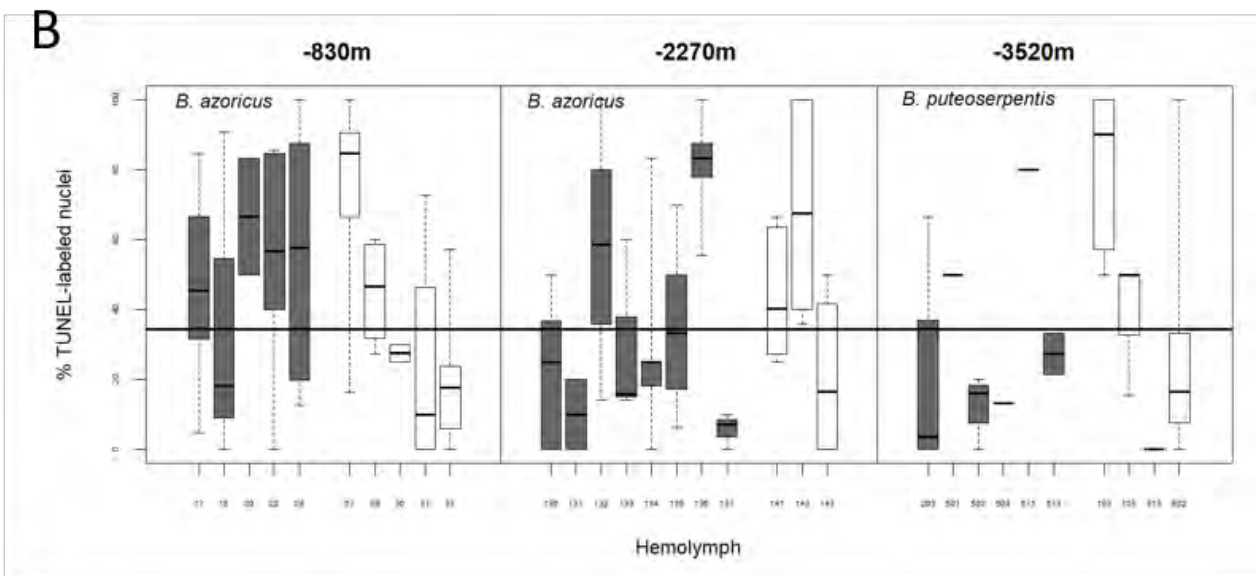
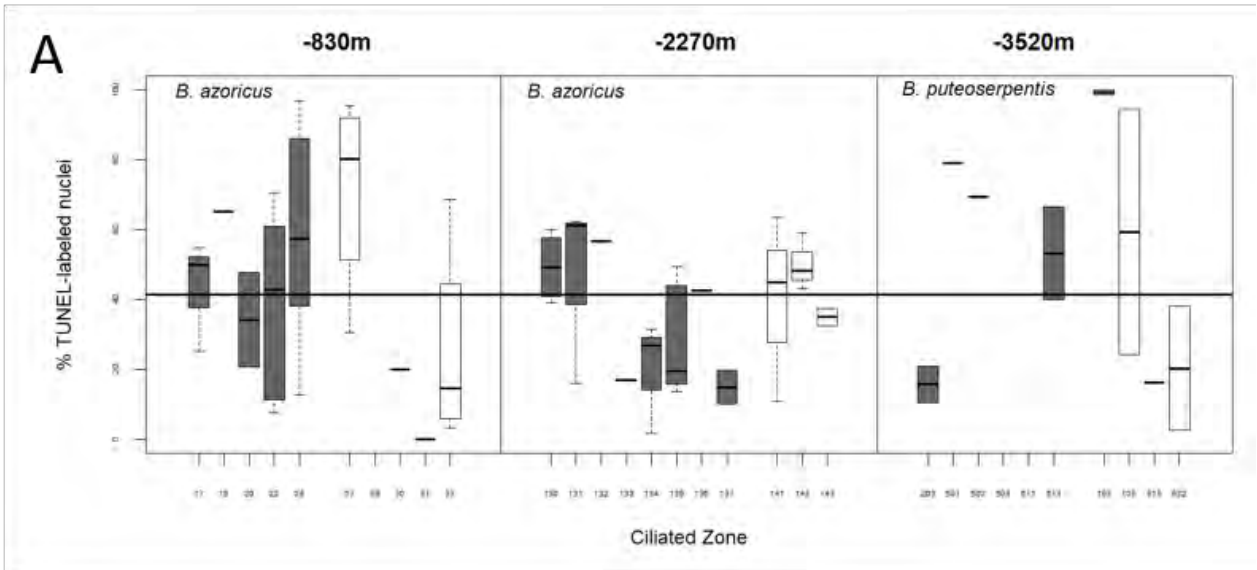
**Supplementary figure 1: Measurements of mussel shells.** Using a caliper, the length, width and thickness of each individual was taken as shown on the figure, and recorded in supplementary table 1.



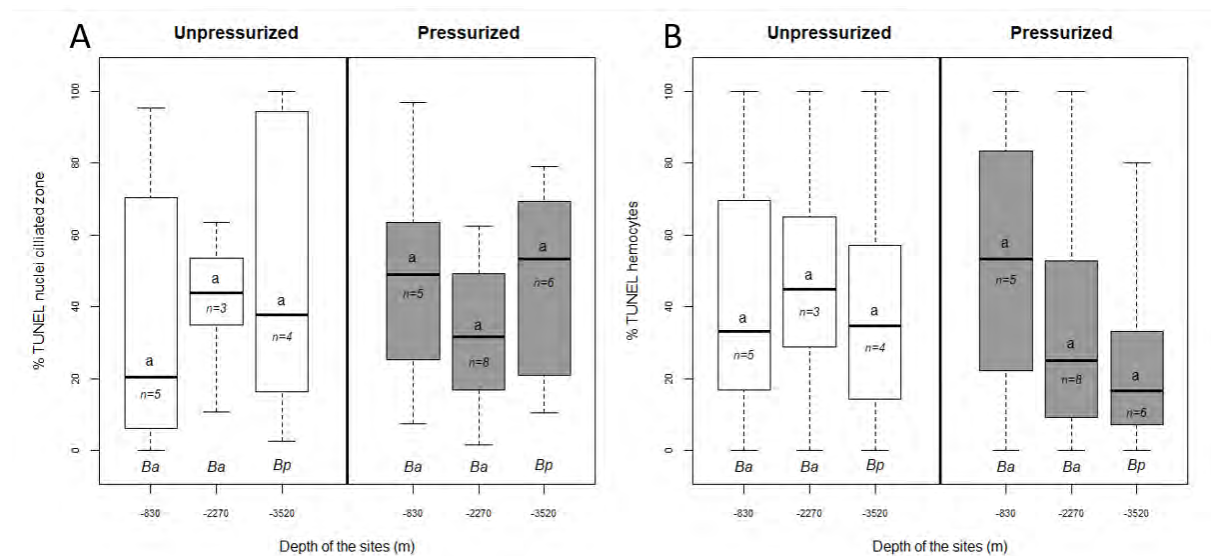
**Supplementary figure 2: Gills of *Bathymodiolus* spp.** A: *Bathymodiolus azoricus* with open mantle cavity showing its two gills. The frame corresponds to the anterior gill part used in this study. B: Gills from one side (adapted from (Le Pennec and Hily, 1984)) showing the unfused W-shaped pairs of demi-branches and the ventral-transversal plane of sectioning across the gill lamellae (orange framed box).



**Supplementary figure 3: TUNEL labelling on gill filaments of *Bathymodiolus azoricus*.** A. Positive control with all nuclei labelled (in green). B. Negative control with non-specific autofluorescent putative mucus-like granules (arrow). Scale bars: 50 $\mu$ m.



**Supplementary figure 4: Percentage of apoptotic nuclei in the ciliated (A), hemolymph (B) and bacteriocyte (C) zones of *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* from the three sites.** White and grey boxplots indicate specimens from non-isobaric and isobaric recoveries, respectively. Boxplot whiskers indicate minimal and maximal values of percentage of TUNEL-labelled nuclei on a single image, the line inside the box is the median, the line inside the box is the median, and the upper and lower frames of the boxes represent the first and third quartile respectively. The horizontal line represents the median of all pictures.



**Supplementary figure 5: Percentage of apoptotic nuclei in the ciliated (A) and haemolymph zones (B) of individual specimens of *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* from the three sites.** Grey and white boxplots indicate specimens from isobaric and non-isobaric recoveries, respectively. No significant differences were seen among groups (Pairwise Wilcoxon with Bonferroni's standard correction). Boxplot whiskers indicate minimal and maximal values on a single image, line inside the box is the median, the line inside the box is the median, and the upper and lower frames of the boxes represent the first and third quartiles respectively.

**Supplementary Table 1: Median percentage of apoptosis in all individuals from the four species in this study, with their shell measurements, collection site, and method of recovery.**

Species	Site	Recovery	Cruise	N°	Length in mm	Width in mm	Thickness in mm	% Apoptosis median	% Apoptosis SD
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	pressurised	BioBaz 2013	17	34	20	14	31.0%	15.4%

<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	pressurised	BioBaz 2013	18	37	21	15	22.6%	12.2%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	pressurised	BioBaz 2013	20	32	18.3	11.2	39.8%	13.0%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	pressurised	BioBaz 2013	22	26.3	14.7	9.3	22.5%	9.6%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	pressurised	BioBaz 2013	24	30.3	17.6	10.2	52.8%	19.5%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	unpressurised	BioBaz 2013	27	42.5	23.2	16	80.4%	31.4%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	unpressurised	BioBaz 2013	29	41	20.3	16.2	11.6%	13.7%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	unpressurised	BioBaz 2013	30	41	21	15	20.8%	13.4%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	unpressurised	BioBaz 2013	31	37.3	20	13.5	4.2%	26.5%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Menez Gwen	unpressurised	BioBaz 2013	33	32	16.8	13	14.4%	11.7%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	pressurised	BioBaz 2013	130	88.5	37.5	32	28.3%	13.7%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	pressurised	BioBaz 2013	131	83	39.5	33.5	55.3%	25.0%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	pressurised	BioBaz 2013	132	79	35	30.5	37.3%	19.7%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	pressurised	BioBaz 2013	133	82.5	36.5	31	13.1%	14%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	pressurised	BioBaz 2013	134	84	37	31.5	21.9%	14.5%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	pressurised	BioBaz 2013	135	67	33.5	25	26.7%	15.7%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	pressurised	BioBaz 2013	136	86	41	32	50.3%	25.4%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	pressurised	BioBaz 2013	137	70.5	33.5	29	6.3%	6.9%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	unpressurised	BioBaz 2013	141	97	41	37	39.4%	11.8%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	unpressurised	BioBaz 2013	142	84	41.5	38	36.5%	15.0%
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Rainbow	unpressurised	BioBaz 2013	143	88	41	35	12.4%	7.9%
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	unpressurised	BICOSE 2014	102	125	60	44	15.9%	9.8%
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	unpressurised	BICOSE 2014	105	89	42	33	26.0%	15.3%
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	pressurised	BICOSE 2014	203	52	30	22	40.9%	25.5%
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	pressurised	BICOSE 2014	501	117	56	47	40.9%	25.5%



<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	pressurised	BICOSE 2014	502	91	47	37	28.7%	16.1%
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	pressurised	BICOSE 2014	504	41	24	17	6.03%	Ø
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	pressurised	BICOSE 2014	511	67	39	31	18.4%	Ø
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	pressurised	BICOSE 2014	514	Ø	Ø	Ø	31.2%	7.7%
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	unpressurised	BICOSE 2014	515	83	44	37	11.4%	Ø
<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i>	Snake pit	unpressurised	BICOSE 2014	522	Ø	Ø	Ø	16.4%	14.5%
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M2	unpressurised	WACS 2011	6	87	31	23	11.3%	12.7%
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M2	unpressurised	WACS 2011	7	113	31	23	26.3%	13.0%
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M2	unpressurised	WACS 2011	8	154	48	37	31.1%	Ø
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M2	unpressurised	WACS 2011	9	162	46	43	7.5%	19.9%
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M2	unpressurised	WACS 2011	10	31	16	11	23.9%	18.8%
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M1	unpressurised	WACS 2011	27	64	24	18	12.5%	7.9%
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M1	unpressurised	WACS 2011	28	74	31	20	8.2%	3.2%
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M1	unpressurised	WACS 2011	30	117	35	27	24.8%	24.0%
<i>Bathymodiolus boomerang</i>	M2	unpressurised	WACS 2011	9H	127	43	36	17.0%	12.8%
<i>Mytilus edulis</i>	Roscoff			6	17	23	14	1.7%	0.8%
<i>Mytilus edulis</i>	Roscoff			4	23	43	18	1.6%	1.2%
<i>Mytilus edulis</i>	Roscoff			5	22	37	16	1.0%	Ø
<i>Mytilus edulis</i>	Roscoff			7	14	23	10	1.1%	Ø
<i>Mytilus edulis</i>	Fishmonger			11	53	Ø	Ø	2.0%	2.3%
<i>Mytilus edulis</i>	Fishmonger			12	48	Ø	Ø	0.7%	0.3%
<i>Mytilus edulis</i>	Fishmonger			13	51	Ø	Ø	1.0%	Ø
<i>Mytilus edulis</i>	Fishmonger			14	56	Ø	Ø	2.2%	0.8%
<i>Mytilus edulis</i>	Fishmonger			15	49	Ø	Ø	2.0%	2.2%

## 4.2 LE RELARGAGE DES SYMBIOTES CHEZ LES BATHYMODIOLES

### 4.2.1 Article 2 : Preliminary evidence for the existence of symbiont release in deep-sea hydrothermal vent mussels

A la suite de cette première partie, l'apoptose se révèle présente à un fort taux chez les bathymodioles comparées aux moules non symbiotiques. Cependant, elle ne concerne pas principalement les bactériocytes et semble donc ne pas être le moyen principal de la diminution des symbiotes dans les branchies. Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés au relargage possible des symbiotes dans l'environnement. Le relargage de symbiotes est bien documenté par exemple chez les coraux lors des épisodes de blanchissement (Weis, 2008) et apparaît comme un moyen de limiter le risque pour un hôte d'être débordé par ses symbiotes, notamment lors de stress physiologiques. Nous avons donc souhaité tester l'hypothèse de l'existence d'un relargage de symbiotes par les bathymodioles au moyen d'expériences *in vivo* en aquairums pressurisés. Ces expériences ont été conduites sur *Bathymodiolus azoricus* lors de la campagne BioBaz, et sur *B. puteoserpentis* lors de la campagne BICOSE. Lors d'expositions en conditions contrôlées d'une durée de 5h dans les aquariums pressurisés BALIST et IPOCAMP, nous avons simulé des environnements plus ou moins favorables aux symbiotes et à l'hôte : eau (témoin), stress thermique, présence de méthane (favorisant les symbiotes MOX), ou présence de sulfures et d'une source de carbone (favorisant les symbiotes SOX). Les moules étaient placées dans de l'eau stérile qui a été récupérée et filtrée à l'issue des expériences afin d'identifier les bactéries s'étant détachés de l'hôte au cours des incubations. L'objectif était de tester si des symbiotes sont retrouvés dans l'eau (initialement stérile) à l'issue des expositions, et si certaines conditions expérimentales entraînent un taux de relargage plus élevé.

La recherche des symbiotes dans l'eau a reposé sur deux techniques : d'une part le métabarcoding des communautés bactériennes présentes dans l'eau pour identifier des séquences identiques à celles des symbiotes, d'autre part la quantification relative de ces séquences par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques des bactéries méthanotrophes et sulfo-oxydantes. L'ADN des filtres des incubations des campagnes BioBaz 2013 et BICOSE 2014 a été extrait, un fragment court du gène codant pour l'ARNr 16S bactérien a été séquencé par pyroséquençage 454 Roche (filtres de la campagne BioBaz 2013) et par Illumina (filtres de la campagne BICOSE 2014). Les séquences ont été ensuite analysées grâce au logiciel Qiime et comparées par BLAST aux séquences contenues dans les bases de données (GENBANK) afin de décrire la composition des communautés bactériennes présentes. Une analyse BLAST a

ensuite été réalisée face à une base de données contenant les séquences d'ARNr 16S des symbiotes connus de bathymodiales afin d'identifier les séquences identiques à celles des symbiotes, pouvant signer la présence de bactéries symbiotiques relarguées par les animaux lors des incubations. Dans tous les filtres, la présence des symbiotes méthanotrophes et sulfuroxydants a été montrée en faible quantité, de même que la présence de séquences de l'*Epsilonproteobacteria* récemment identifiée chez certains *Bathymodiulus* (Assié *et al.*, 2016) et de la bactérie intranucléaire (Zielinski *et al.*, 2009).

Les résultats de ces travaux indiquent qu'au cours des expériences d'exposition d'une durée de 5h, les bathymodiales ont relargué une faible quantité de leurs symbiotes, comparable entre les différents traitements pour une série d'expériences données (campagne BioBaz ou BICOSE). La provenance de ces symbiotes n'a pas pu être établie. Les symbiotes pourraient venir de la branchie, mais aussi pourquoi pas d'autres tissus ou du biofilm recouvrant la coquille puisqu'ils semblent pouvoir y être présents (Crépeau *et al.*, 2011). Néanmoins, ce relargage à « bas bruit » pourrait suffire àensemencer le milieu environnant, rendant disponible des symbiotes qui pourront entrer en association avec les nouveaux individus ou bactériocytes par transmission latérale.

Ce travail fait l'objet d'un manuscrit en préparation qui sera soumis au cours des prochains mois.

# Preliminary evidence for the existence of symbiont release in deep-sea hydrothermal vent mussels

Bérénice Piquet<sup>1,2</sup>, Kamil Szafranski<sup>2</sup>, Nelly Léger<sup>2</sup>, Bruce Shillito<sup>2</sup>, Ann C. Andersen<sup>1</sup>, Sébastien Duperron<sup>3,4</sup>

1: Sorbonne Université, CNRS, Lab. Adaptation et Diversité en Milieu Marin, AD2M, Team : Adaptation et Biologie des Invertébrés marins en Conditions Extrêmes, ABICE, Station Biologique de Roscoff, SBR, 29680 Roscoff, France.

2: Sorbonne Université, MNHN, CNRS, IRD, UCN, UA, Lab. Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques BOREA, Team : Adaptation aux Milieux Extrêmes, AMEX, 7 Quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

3: Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Lab. Mécanismes de Communication et Adaptation des Micro-organismes, Team : Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement, CCE, 12 rue Buffon, 75005 Paris, France.

4: Institut Universitaire de France, Paris, France.

## Introduction

*Bathymodiolus azoricus* and its sister species *B. puteoserpentis* live along the northern Mid-Atlantic Ridge and dominate the fauna of the hydrothermal vent (Cosel *et al.*, 1994, 1999). They owe their adaptive success to their gammaproteobacterial bacterial symbionts. They associate with a sulfur-oxidizing and a methanotrophic bacterium which use reduced chemical compounds originating from vent fluids, respectively methane for the former, and sulfide and dihydrogen for the latter. The energy is used to fix carbon (Cavanaugh *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 2011). Endosymbionts are housed inside host gills in special cells named bacteriocytes and ensures the major part of mussel nutrition. *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* accommodate other less abundant symbionts including an intranuclear, potentially parasite bacterium and, only in *B. azoricus*, *Epsilonproteobacteria* that establish atop gill epithelial cells which role is less know (Zielinski *et al.*, 2009; Assié *et al.*, 2016).

Dual symbiosis involving two different bacterial metabolisms and the flexibility of this association are key to mussels ability to cope with a variety of environmental conditions and their spatial and temporal variations (Distel and Cavanaugh, 1994; Fiala-Medioni *et al.*, 2002). The abundance of each endosymbiont changes according to the availability of substrates used by methanotrophs and sulfur-oxidizing bacteria (Halary *et al.*, 2008; Riou *et al.*, 2008; Szafranski *et al.*, 2015; Duperron *et al.*, 2016). If no substrate is available for either symbionts, *Bathymodiolus* mussels can lose all their endosymbionts (Kádár *et al.*, 2005).

It is assumed that *Bathymodiolus* acquire their bacteria horizontally, from their environment. All epithelia of mussels are infected by bacteria in early post-larval stages but symbionts are only found in gills after a period (Salerno *et al.*, 2005; Wentrup *et al.*, 2013). It is hypothesized that adults can become infected by bacteria throughout their entire life either by bacteria released from older gill tissues or by free-living forms (Wentrup *et al.*, 2014). However very little is known about the existence and abundance of free-living forms of the symbionts. If *Bathymodiolus* acquire their symbionts in post larval stages and throughout their life cycles, there must exist either a stock of free-living forms of both symbionts (environmental acquisition) or the symbionts have to be released from mussels so they can colonize new specimens (lateral acquisition). Sea anemone and corals can for example release their symbionts in particular when exposed to stresses such as an increase in temperature (Lesser, 2004; Perez, 2006).

In order to test the hypothesis of symbiont release by live mussels, an experiment was designed on specimens of *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis*. Specimens were first recovered using a pressure-maintaining sampling cell (PERISCOP - Projet d'Enceinte de Remontée Isobare Servant la Capture d'Organismes Profonds) that allows maintaining their native pressure and temperature throughout recovery, avoiding recovery bias. They were then transferred to sterile seawater containing (or not) substrates, and then maintained for 5 hours in the IPOCAMP pressure vessel (Shillito *et al.*, 2008, 2014). After this, the water was recovered and the occurrence of symbionts was tested using high-throughput bacterial 16S rRNA sequencing using general primers to identify the bacteria present in water, and qPCR using bacteria- and symbiont-specific primer sets to confirm the presence of symbionts and estimate their abundance. (Szafranski *et al.*, 2015; Duperron *et al.*, 2016). This is the first attempt to test the symbiont release hypothesis in deep-sea mussels.

## **Material and methods**

### Mussel collections

Specimens of *Bathymodiolus azoricus* were sampled from Lucky Strike (Tour Eiffel marker: 37°17.333N; 32°16.541W, 1690 m depth) during the BioBaz 2013 cruise on the Mid-Atlantic Ridge (Lallier, 2013). Mussels were recovered within 45 minutes using the PERISCOP.

Specimens of *Bathymodiolus puteoserpentis* were collected during the BICOSE 2014 cruise (Cambon-Bonavita, 2014). Specimens were sampled on the hydrothermal vent site Snake Pit,

close to the “Elan” marker 107 (23°22'54"N, 44°55'48"W, 3520 m depth). Mussels were recovered within 45 minutes using the pressure-maintaining device PERISCOP.

#### Exposure experiments and sample fixation

Upon recovery mussels were transferred within 10 minutes to 1 liter Naglen bottles containing sterile-filtered seawater (0.22 $\mu$ m). For specimens of *Bathymodiolus azoricus*, from the BioBaz cruise mussels were incubated during 5 hours in sea water containing 11.8mM NaHCO<sub>3</sub> and 36.4 $\mu$ M Na<sub>2</sub>S, or with sea water alone. Each incubation was conducted twice, on two separate sets of mussels. For *B. puteoserpentis* specimens from the cruise BICOSE conditions were as follows: plain seawater; seawater containing 11.8 $\mu$ M NaHCO<sub>3</sub> and 36.4 $\mu$ M Na<sub>2</sub>S; seawater containing 11.8 $\mu$ M NaHCO<sub>3</sub>; and methane-saturated seawater. All incubations were performed in pressure vessels (BALIST or IPOCAMP) at their native pressure (*i.e.* corresponding to the sampling site) and a temperature of 4-8°C for 5 hours. Mussels from these experiments were recently used to investigate the ratio between the two types of bacteria inside gills (Szafranski *et al.*, 2015; Duperron *et al.*, 2016). Following incubation, mussels were removed and water bathing the mussels was recovered and filtered on a 0.22 $\mu$ m nitrocellulose filter. Filters were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing back to the lab.

DNA extraction and 16sRNA-based metabarcoding of bacterial communities in water DNA was extracted from filters using the DNeasy blood and tissue Kit following manufacturer's instructions (Qiagen, CA). Filters were cut in small pieces and incubated for 1h in a buffer containing proteinase K prior to the procedure. The quality of DNA was assessed on an agarose gel. The presence of bacterial DNA was tested by performing a PCR using bacterial primers 27F and 1492R (Lane, 1991). PCR-responsive DNA samples were sent for sequencing. Sequencing of the V5-V6 region of the bacterial 16S rRNA (Yarza *et al.* 2014)(Yarza *et al.* 2014)(Yarza *et al.* 2014)(Yarza *et al.*, 2014) (Yarza *et al.*, 2014) from filters collected during the BioBaz cruise was done on a 454 platform (GenoScreen, France) using primers Bact2F (778F, 5'-CAAACAGGATTAGATACCCTG-3') and Bact2R (1082R, 5'-CGTTRCGGGACTTAACCCAACA-3'). Samples from the BICOSE cruise were processed on an Illumina HiSeq platform (GATC Biotech, Germany). The V1-V3 region was amplified using primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') and paired-end sequencing was performed (2x250bp).

#### Sequence analysis

All analysis were performed using QIIME 1.9 (Caporaso *et al.*, 2010). Paired-end Illumina sequences were assembled. A quality filter (phred quality =5) was used to filter out some likely sequencing errors. Sequences containing mismatches in the barcode or primer sequence, or containing Ns were discarded, and sequences which sizes were above 200 or below 320 for 454 sequencing methods, and 460 and 540 for Illumina sequencing were excluded. Chimeras were identified using ‘usearch61’ and discarded. Sequences were grouped as Operational Taxonomic Units (OTUs) using Qiime with a 97 % sequence similarity criterion. OTU table, indexes, rarefaction curves and nMDS plots were prepared using R with the Vegan package (R core, Oksanen 2011). OTU sequences were affiliated to bacterial groups based on comparisons with the Silva database, release 128 (Quast *et al.*, 2012) OTUs with abundances above 1 % in at least one of the samples were individually compared to the GENBANK database using BLAST (Altschul, 1997).

#### Identification of symbiont-related OTUs

A homemade database consisting of full length 16S rRNA sequences of symbionts of mussels was constructed based on sequences from GENBANK as well as sequences from the lab (Supplementary table 1) Sequences from recently identified *Epsilonproteobacteria* epibionts were added, as well as sequences obtained from NIX intranuclear parasites (Zielinski *et al.*, 2009; Assié *et al.*, 2016). The database, consisting of 90 sequences, was used to perform a search against obtained OTU sequences using ‘blast\_wrapper.py’ in QIIME. OTUs displaying sequence similarities above 99% for 454 sequencing and 99.9% for Illumina with at least one of the sequences from the database were qualified as potential symbiotic bacteria and further investigated, whatever their abundance (even below 1%, though not when they occurred as singletons).

## Results

#### Experiments and DNA extractions

Mussels were maintained alive throughout all experiments with no recorded mortality. Pressure and temperature were stable throughout exposure experiments. After experiments, mussels were dissected and used for other analyses (see (Szafranski *et al.*, 2015; Duperron *et al.*, 2016)). DNA extraction from sterile-filtered seawater used to initially fill the Nalgen bottles (pre-exposure) failed to yield visible DNA on gel, and no PCR product could be obtained despite

repeated attempts with both primer sets, suggesting absence or very low abundance of bacteria in the water used to incubate mussels at time zero. DNA was successfully extracted and PCR amplifications of the bacterial 16S rRNA-encoding gene yielded strong bands at the expected size on filters from all exposure experiments (post-exposure). Lack of DNA and PCR amplification in the filtered seawater prior to exposure indicates that the DNA recovered after incubations likely comes from bacteria associated with incubated mussels.

#### Composition of bacterial communities recovered from filters based on 16S rRNA sequences

In the experiments performed during BioBaz, 66,336 raw reads were obtained (454 sequencing). After quality filtering 22,662 sequences were further analyzed and resulted in 324 OTUs (97% similarity level). Communities from filters from the two incubations in seawater and one incubation in sulfide and bicarbonate were dominated by Gammaproteobacteria (96 to 99% of reads), with OTUs belonging to the genus *Vibrio* representing up to 52 % in one seawater incubation (99% identity). An OTU displaying 99% sequence identity with *Pseudoalteromonas prydzensis* represented 14.5% to 88% of the reads (Figure 1 and table 1). According to the nMDS plot (figure 2), community compositions in filters from the seawater and bicarbonate/ sulfide treatment 1 were most similar, in the NMDs, both dominated by *Pseudoalteromonas prydzensis* (respectively 88 and 84%). The filter from the second sulfide/bicarbonate experiment was on the other hand dominated by *Epsilonproteobacteria* (69.3%, of reads representing 33 OTUs).

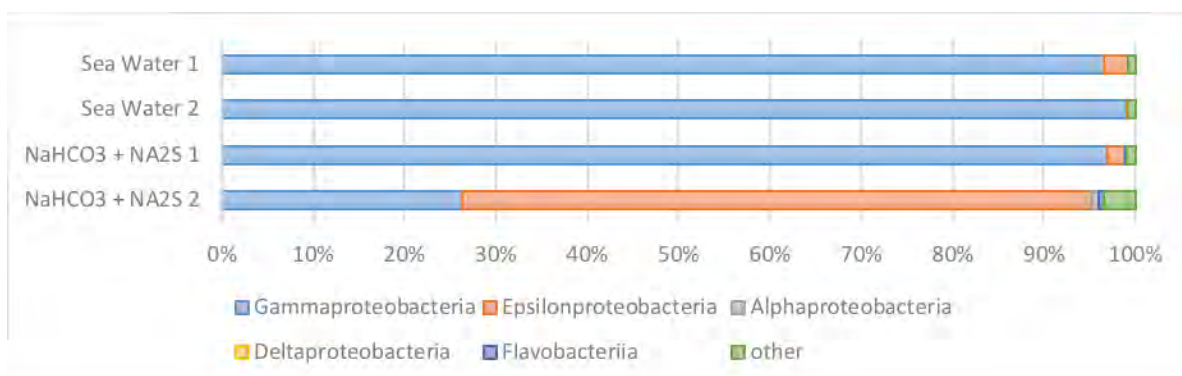


Figure 1: Composition of bacterial communities of filters *B.azoricus* from BioBaz 2013 at the sub-phylum level. (All OTUs except singletons)



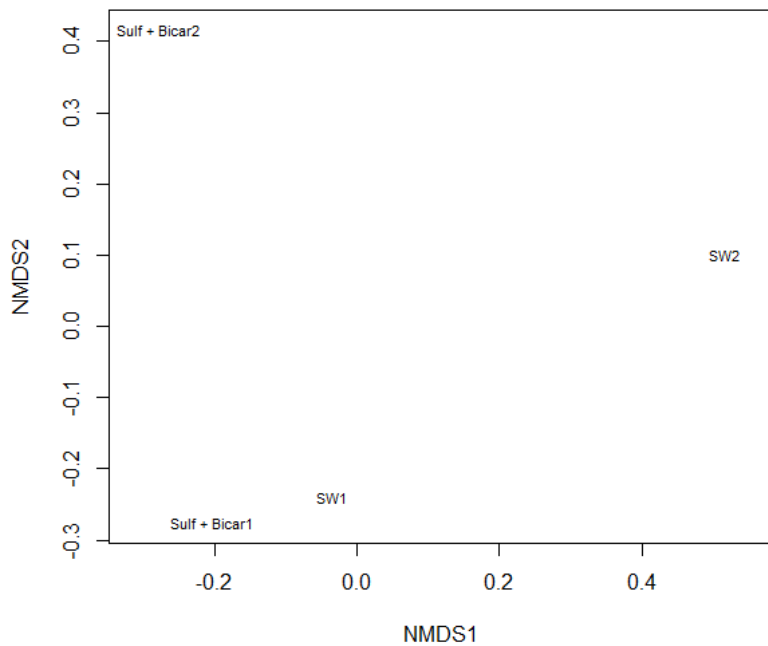


Figure 2: nMDS plots based on the calculation of similarity matrix of Bray Curtis filters for *B. azoricus* from BioBaz 2013. SW: Sea Water ; Sulf + Bicar: Sulfure + bicarbonate.

In the experiments performed during BICOSE, 15,678,880 raw reads were obtained (Illumina paired-end sequencing). After quality filtering, 2,359,060 were further analyzed which yielded 17,904 OTUs at the 97% similarity level. *Epsilonproteobacteria* were dominant in all 4 filters (37.8% to 48.6%, mean 44%) followed by Flavobacteria (22% to 30.2%, mean 26%). *Gammaproteobacteria* represented on average 10.7 % of the sequences (figure 3 and table 2). NMDs plot indicates that not much differences (figure 4).

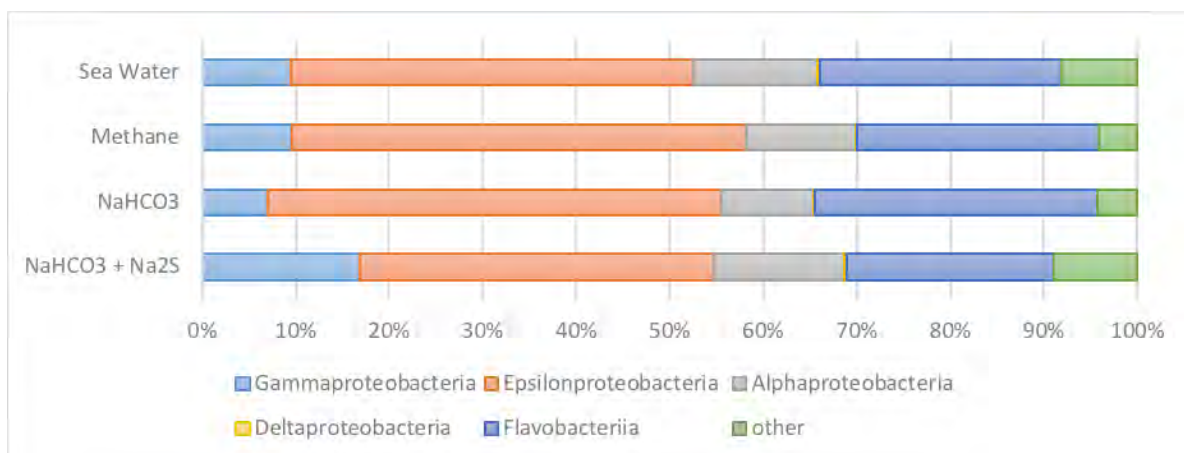


Figure 3: Composition of bacterial communities of filters *B. puteoserpentis* from BICOSE 2014 at the sub-phylum level. (All OTUs except singletons)

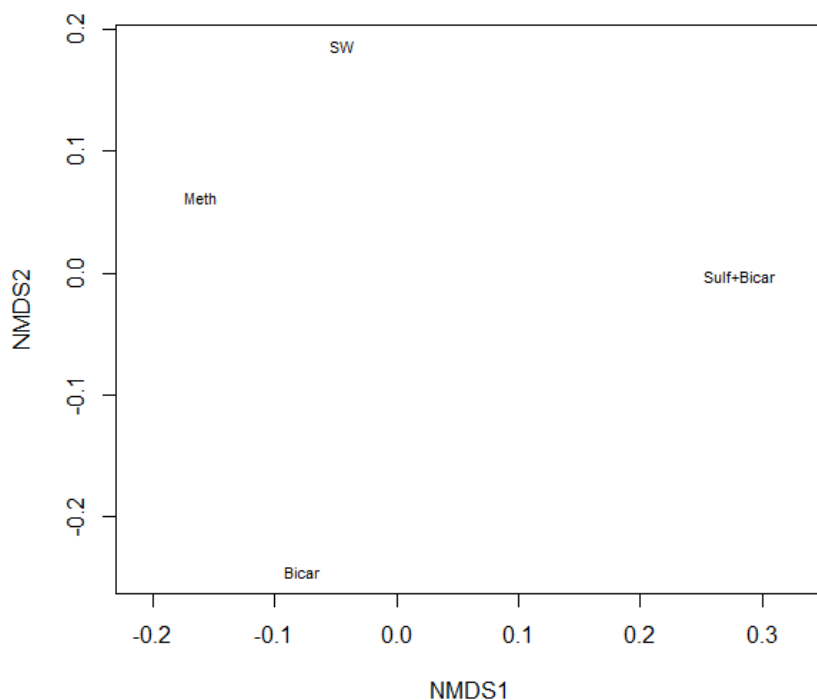


Figure 4: nMDS realized from the calculation of similarity matrix of Bray Curtis filters for *B. puteoserpentis* from BICOSE 2014. SW : Sea Water ; Bicar : bicarbonate ; Meth : Methane ; Sulf + Bicar: Sulfure + bicarbonate

#### Identification of OTUs highly similar to sequences of reported mussel symbionts

In the BioBaz experiments conducted on *Bathymodiolus azoricus*, one OTU displaying 99.33% sequence identity with the sulfur-oxidizing gill endosymbiont of *Bathymodiolus puteoserpentis* was identified in all filters and represented 0.11% to 3.3% of the reads. An OTU displaying 99.12% sequence identity with the methanotrophic endosymbiont of *Bathymodiolus azoricus* was found in all but one filter, representing 0.02 to 0.12% of reads. It was absent from the reads from one of the two sulfide/bicarbonate filters. In this latter filter, an OTU displaying 99.7% sequence identity with an intranuclear bacterium was discovered. Finally, presence of OTUs 99.3% identical to an epsilonproteobacterial epibiont of *Bathymodiolus azoricus* was recovered in three filters (table 3).

In the experiments conducted on *B. puteoserpentis* during the cruise BICOSE, 13 OTUS matched with endo-, ecto- and intranuclear symbionts of mussels with 100% sequence identity.

All symbiont types were present in all filters. 3 OTUs were identical to sequences of methanotrophic symbionts of *Bathymodiolus azoricus* and 4 were identical to sulfur-oxidizing symbionts of *Bathymodiolus azoricus*. 3 OTUs were identical to ectosymbiotic *Epsilonproteobacteria* of *Bathymodiolus spp.* and finally 3 OTUs to the endonuclear bacterium of *Bathymodiolus spp.* (table 4).

#### Discussion

Because no bacterial DNA could be amplified from sterile-filtered seawater, bacterial DNA recovered after incubations certainly belongs to bacteria that were somehow associated with mussels. Mussels contain between  $3.4 * 10^{11}$  and  $8.6 * 10^{12}$  bacteria within their gill tissue. However bacteria are also present on the skin, and on the shell of mussels (Crépeau *et al.*, 2011; Duperron *et al.*, 2016). According to our experimental design, it is not possible to ascertain whether bacteria identified in the water originated from either one of these compartments.

#### Bacterial communities retrieved from seawater

In the case of filters obtained from experiment on *Bathymodiolus azoricus* (cruise BioBaz), two filters were dominated by *Pseudoalteromonas prydzensis*. This psychrotrophic bacteria is found from the Antarctic sea ice to the shallow water hydrothermal vent of Espalamaca (Faial, Azores) (close to site of sampling) (Bowman, 1998; Rajasabapathy *et al.*, 2014). A more intriguing result is the abundance of sequences from *Vibrio spp.*, some of which are known to be bivalve pathogens (for example *Vibrio diabolicus* (Barros *et al.*, 2016) ). This suggests that the batch of mussels had to be infected (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Generally, in these filters, read counts were dominated by one OTU, a result that is confirmed by the low values in the Shannon and inverse simpson, index of richness species (Table 5).

Indices	Shannon	Inverse simpson	Chao1	ACE
Sea Water 7	0.86	1.28	180.52	189.93
Sea Water 11	1.76	3.01	115.80	126.59
NaHCO3 + Na2S 1	1.00	1.40	149.94	170.56
NaHCO3 + Na2S 3	2.91	7.70	112.25	134.47

Table 5: Species richness and diversity indices calculated for each filters for *B. azoricus* from BioBaz 2013.

In the case of filters from experiments conducted during the cruise BICOSE on *B. puteoserpentis*, the 4 filters displayed similar communities and the species richness and diversity indexes were also similar, suggesting comparable communities whatever the incubation condition tested (Table 6). The dominance of *Epsilonproteobacteria* is not surprising given that this group is found in high abundances around hydrothermal vents on rock surfaces, surface of mollusk shells (Crépeau *et al.*, 2011), surface of arthropods (Durand *et al.*, 2015), as well as colonization devices (Lopez-Garcia *et al.*, 2003; Szafranski *et al.*, 2015).

Indices	Shannon	Inverse simpson	Chao1	ACE
Sea Water	4.69	30.90	16005.19	16579.60
Methane	4.52	25.49	16313.93	16900.05
NaHCO <sub>3</sub>	4.36	23.11	14687.23	15186.61
NaHCO <sub>3</sub> + Na <sub>2</sub> S	4.82	38.04	14546.10	15135.64

Table 6: Species richness and diversity indices calculated for each filters for *B. puteoserpentis* from BICOSE 2014.

A different methodology was employed for the two sets of experiments (454 versus Illumina, on different hypervariable regions). Given that the two sets of experiments were done independently, on two separate sites and curses, and on two distinct (though closely related) mussels species (O'Mullan *et al.*, 2001; Faure *et al.*, 2009; Lorion *et al.*, 2013), any direct comparison between filters from BioBaz and BICOSE would be hazardous at thi stage, and the composition of bacterial communities in the two experiments can thus not be directly compared.

On other hand, OTUs highly similar to identical to those of symbionts were identified consistently on all filters in both sets of experiments.

Symbiont related sequences are being released from mussels

OTUs affiliated to symbionts of *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* were observed in all filters but each time in low abundances and never among the most abundant OTUs (3.10<sup>-5</sup>% to 3.29% of sequences). This suggests a relatively stable and low level of symbiont release in mussels in all conditions tested. Among these, sequence identical to the sulfur- and methane-oxidizing symbionts were present, but sequences from other rare symbionts were also found, including the NIX intranuclear bacteria and the recently identified *Epsilonproteobacteria*

epibionts (Zielinski *et al.*, 2009; Assié *et al.*, 2016). Sequences highly similar to identical to those of symbionts occurred in all conditions tested and for the two species. This suggests that symbionts are part of the bacteria that are being released from mussel hosts, alongside with other bacteria, some of which potential pathogens as the *Vibrio* found in the BioBaz filters. Neither exposure to plain water, nor to methane or sulfide seems to trigger massive release of symbionts within the 5 hours of the exposure. By no way does this mean that massive release is impossible in mussels, and other stressful conditions such as really high sulfide, oxygen or temperature might be necessary and need to be tested. Besides

How do mussels dribble release their symbionts?

The bacteria identified as potential symbionts could have been released by the mussel's gills. A possible mechanism for this would be the release of bacteria via bacteriocytes apoptosis. Indeed, 19% of bacteriocytes in gills are potentially dying cell (Piquet *et al.*, 2018). One of the first steps of apoptosis (in greek 'falling off leaves from trees') is the separation of the cell from its neighbors and, in the case of an epithelium, the detachment from the basal lamina (Kerr *et al.*, 1972; Häcker, 2000). By this mechanisms, symbiont can be released in the mussels environment. Alternatively, it has been suggested that free-living forms of the symbionts, or at least close relatives, occur in the biofilm that covers the shell which may also be a source of release (Crépeau *et al.*, 2011).

With our results, it is not possible to determine whether the sequences identified correspond to metabolically active symbionts, because we used DNA-based approaches. RNA-based investigation and FISH will be necessary. FISH and host DNA search would also help to figure whether the released symbionts are still attached to remnants of host cells. Detecting symbiont DNA in the water after incubations of mussels is nevertheless intriguing. In the case of lucinids, some work has shown that symbionts were not released from host gills (Brissac *et al.*, 2009). Symbiont release is a way by which symbionts may escape a host, and potentially infect aposymbiotic new hosts through host-host lateral transfer. Mussels establish symbiosis shortly after settlement, so this mechanism might be important in symbiont acquisition (Laming *et al.*, 2015). Whether the apparently low level of symbiont observed herein is sufficient to make symbiont available to aposymbiotic post-larvae mussels is questionable. However, for example, the light-producing bacterium *Vibrio fischeri* efficiently infects the juvenile squid *Euprymna scolopes* despite that this bacterium is a relatively rare constituent of Hawaiian seawaters bacterioplankton, representing as little as 0.1% of the bacteria (Nyholm and McFall-Ngai, 2004). Here, under completely different conditions though, we have between 0.0001 and

3.29% of sequences affiliated to endosymbionts within only 5 hours, so it could be sufficient to infect new specimens.

In our experiments, it cannot be ascertained whether the symbiont sequences originate from bacteria released by the gills, or from other host compartments (skin, shell...). Nevertheless, they occur, suggesting that the simple presence of adult *Bathymodiolus* provides a source of bacterial symbionts to the neighbors. To test where do the symbionts come from, it would be necessary to separate gill and shell, and/or use mussels with surface-sterilized shells in order to know from which compartment do the sequences obtained actually come.

The symbiont part of the holobionts life cycle is still mostly unknown. Whether integrating a bacteriocyte is a dead end for bacteria, and whether bacteria can return to the environment and occur free-living are still open questions. The example of the tubeworm *Riftia pachyptila* is interesting as a comparison. Hydrothermal vent tubeworms live in symbiosis and acquire bacteria at a post-larvae stage and these proliferate in a newly formed organ named trophosome. They are not released during the life of the host, but once adult worms die, symbionts are released rapidly and proliferate outside in the environment (Klose *et al.*, 2015). These bacteria are then available for new *Riftia* larvae. Whether symbionts can also be released after death in the case of mussels thus warrants further investigation.

Table 1 : Table of OTUs which represent more than 1% of reads in BioBaz filters. Numbers correspond to % of the total reads.

OTU	sea water 1	sea water 2	NaHCO3 + NA2S 1	NaHCO3 + NA2S 2	Ident %	Accession	description
denovo217	1,551871	48,37319	0,046718	0,372671	99	MG456764	Vibrio scophthalmi strain IMCC34225 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
					99	CP016228 AJYY01000000 AJYY01000001- AJYY01000189	Vibrio crassostreae 9CS106 chromosome 1, complete sequence.
					99	KY245943	Vibrio cyclitrophicus strain HM-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KY604833	Vibrio mediterranei strain NIOSSK079#71 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KY229805	Vibrio shilonii strain M14-00201-9H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo161	0	0	0,046718	1,118012	99	FR839203	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone RS2-85.
					99	FR839196	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone RS2-16.
					99	EU617773	Uncultured bacterium clone A13S-85 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	DQ228659	Uncultured bacterium clone CH2b70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo285	0,106293	0	0,070077	2,484472	99	AB013826	Uncultured gamma proteobacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: NB1-e.
					99	FN562870	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone aA12.
					98	AB842291	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: gut_m34.
					98	KP896669	Uncultured bacterium clone Tams9_18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo314	0,042517	1,097609	0	0	98	AB629189	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: Sm4rk097U.
					98	AB629269	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: Sm4sw033U.
					99	KC534435	Vibrio crassostreae strain VSD910 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KF799762	Uncultured bacterium clone SanDiego_a6495 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo339	0,297619	0	0,186872	5,962733	99	MG456764	Vibrio scophthalmi strain IMCC34225 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	MG271706	Unidentified microorganism clone edSeq15_4-D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	MG264177	Vibrio anguillarum strain 2NS-PRS3-a2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KU644654	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 864B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KU644653	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 864A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo383	0,106293	1,411211	0	0	99	KU644652	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 1600J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KU644648	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone M6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KU644647	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 1600I 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	JN606903	Uncultured bacterium clone GA21049c11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo383	0,106293	1,411211	0	0	99	DQ642809	Vibrio sp. 6(2006) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KY377701	Uncultured bacterium clone OTU4596 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					98	KF577027	Vibrio sp. VibC-Oc-025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

					98	KF577026	Vibrio sp. VibC-Oc-022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo411	0,127551	0	0,140154	1,36646	99	FN393026	Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone R_c18_E7.
					99	EF441902	Uncultured epsilon proteobacterium clone RT07B_BI_44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	HQ894169	Uncultured bacterium clone 37_B08_F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	FM881772	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone R62LS.
					99	FM863741	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone R17LS.
denovo461	0,021259	0	0,046718	1,118012	98	FR839203	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone RS2-85.
					98	JQ800146	Colwellia sp. KJF9-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					98	JQ586298	Uncultured bacterium clone SR10-51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					98	JN018493	Uncultured bacterium clone 10-4-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo469	0,212585	0	0,023359	2,360248	98	GU061308	Uncultured gamma proteobacterium clone 20m-63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					98	LC171259	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: NBC_1-47.
					98	AB842282	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: gut_a56.
					97	AB629304	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: Sm7sw070U.
					97	AB629189	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: Sm4rk097U.
denovo497	88,22279	31,43865	84,32609	14,53416	97	AB629269	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: Sm4sw033U.
					99	KC534443	Pseudoalteromonas prydzensis strain VSG920 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KC534434	Pseudoalteromonas prydzensis strain VSD909 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	JN233423	Uncultured marine bacterium clone OS3SD20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	MF351882	Pseudoalteromonas sp. strain Dol 1-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo5	0,085034	2,900823	0,070077	1,863354	99	MF975561	Pseudoalteromonas sp. strain CF2-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	MF571798	Uncultured bacterium clone 48V1B48_H06_034 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	MF571784	Uncultured bacteria 16S rRNA clones from Gulf of Mexico during Deepwater Horizon oil spill
					99	KX172414	Uncultured bacterium clone EzyYy124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	MF571771	Uncultured bacteria 16S rRNA clones from Gulf of Mexico during Deepwater Horizon oil spill
denovo502	0,042517	0	0	1,73913	99	KX172393	Following the oil fallout: bacterial community succession in Gulf of Mexico seafloor sediment after the 2010 Deepwater Horizon blowout
					99	FN562857	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone bH8.
					99	AM902726	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SC16S37.
					99	AJ515717	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone 11.
					99	AJ515716	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone 15.
denovo508	0,14881	0	0,163513	2,484472	99	FN562856	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone bE9.
					99	FR839216	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone RS2-57.
					99	AY225614	Uncultured epsilon proteobacterium clone AT-cs3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	FN658695	Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Epsilon S1-1.
					99	AY225616	Uncultured epsilon proteobacterium clone AT-co11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	EF441904	Uncultured epsilon proteobacterium clone RT07B_BI_107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.



denovo541	0,021259	1,25441	0	0	98	KP183027	Uncultured Vibrio sp. clone 125_133 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					97	KT023561	Vibrio sp. HQN-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					97	KT023539	Vibrio comitans strain HZN-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					97	KR347317	Vibrio comitans strain CQN-35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					97	KR347229	Vibrio comitans strain CQB-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo583	0,276361	0	0,537258	7,080745	99	AF449243	Uncultured epsilon proteobacterium clone R76-B30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	FR839220	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone RS2-72.
					99	AF449245	Uncultured epsilon proteobacterium clone R76-B47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	FR839110	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone tDR40R.
denovo592	0,14881	0	0,093436	7,826087	99	JQ287098	Uncultured bacterium clone 3M23_069 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	FR839223	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone RS2-74.
					99	FR839175	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone RS1-33.
					99	HQ894164	Uncultured bacterium clone 30_B03_F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo604	0,14881	1,568013	0,186872	0,248447	99	FN562836	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone aD1.
					97	AJ575989	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone T6-Ph07-889.
denovo608	0,276361	0,117601	3,293623	2,111801	97	HQ225397	Uncultured bacterium clone SF-Jan-61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	LN871183	Bathymodiolus azoricus thioautotrophic gill symbiont partial 16S rRNA gene, isolate BazSymB.
					99	DQ321711	Bathymodiolus azoricus thioautotrophic gill symbiont 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	AM083972	Thiotrophic endosymbiont of Bathymodiolus azoricus (Lucky Strike) partial 16S rRNA gene, clone aLS-4-3.
denovo655	0,14881	0	0	1,118012	99	AM083971	Thiotrophic endosymbiont of Bathymodiolus azoricus (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-5-159.
					99	AM083969	Thiotrophic endosymbiont of Bathymodiolus azoricus (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-3-157.
					99	KT257812	Uncultured bacterium clone Tica13Con_1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KP896643	Uncultured bacterium clone Tams4_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo659	0,488946	0	0,256949	30,18634	99	JN662057	Uncultured epsilon proteobacterium clone LF8CBb62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KP896679	Uncultured bacterium clone Tams9_29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	FN562854	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone bB6.
					99	DQ071277	Uncultured epsilon proteobacterium clone L50-WB13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	AY225622	Uncultured epsilon proteobacterium clone AT-cs8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo72	0,722789	0,274402	1,588414	0,248447	99	AF449249	Uncultured epsilon proteobacterium clone R76-B67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	AJ441208	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone P. palm C/A 55.
					98	FN658696	Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Epsilon S2-16.
					98	KC534443	Pseudoalteromonas prydzensis strain VSG920 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					98	KC534434	Pseudoalteromonas prydzensis strain VSD909 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo72	0,722789	0,274402	1,588414	0,248447	98	KX989445	Pseudoalteromonas sp. strain KSTI79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
					98	KX989396	Pseudoalteromonas sp. strain KSTI30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
					98	KX989330	Pseudoalteromonas sp. strain JLT78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Table 2 : Table of OTUs which represents more than 1% of reads in BICOSE filters. Numbers correspond to % of the total reads.

OTU	Sea water	Methane	NaHCO3	NaHCO3 + NA2S	Ident %	Accession	description
denovo13832	1,34	3,83	1,02	0,64	99	HG425667	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone YK06-05_957_Bac_51.
					99	HG425622	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone YK06-05_957_Bac_104.
					99	GQ261780	Uncultured epsilon proteobacterium clone 70mos_0s_H9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	AY197378	Uncultured proteobacterium clone B01R006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	AY549001	Uncultured bacterium clone sacC13A3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo10021	1,26	0,55	3,59	1,08	99	FR797946.1	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SE6J13ScbB80.
					99	FR797949	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SE6R16ObA29.
					98	EF441910	Uncultured epsilon proteobacterium clone RT07C_BI_75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					98	AY225610	Uncultured epsilon proteobacterium clone AT-pp13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					97	KF439013	Bacterium episybiont of Kiwa sp. clone ARB_2269F39B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo13088	11,57	14,28	14,02	8,26	100	AY225622.1	Uncultured epsilon proteobacterium clone AT-cs8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	AB980088	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: gut_h09.
					99	FN658695	Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone Epsilon S1-1.
					99	AB464811	Uncultured epsilon proteobacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: pYK04-19B-50.
					99	LT855323	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium partial 16S rRNA gene, clone SP_MG_73.
denovo13837	2,67	2,28	2,24	1,89	99	KT257775	Uncultured bacterium clone Tica9Exp_3C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	AF449224	Uncultured alpha proteobacterium clone R103-B9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KC682588	Uncultured bacterium clone TuiMs_C8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KM356416	Uncultured bacterium clone AN_5119N_bac_E8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	AF449223	Uncultured alpha proteobacterium clone R103-B28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo16100	4,13	4,56	4,22	3,73	99	LT855343	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SP_LB_64.
					99	FR797916	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SE6R14LbB94.
					99	FR797919	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SE6R16ObA98.
					99	LT855361	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone TAG_SC_13.
					99	LT855348	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone TAG_LB_52.
denovo47030	4,02	3,83	3,85	2,84	99	FR670477	Uncultured Bacteroidetes bacterium partial 16S rRNA gene, clone LSmat.B130
					98	FN562904	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone bB1.
denovo18000	2,38	2,10	1,69	0,01	97	JX854162	Aquimarina sp. MAR_2010_215 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo46029	2,97	3,57	2,69	2,84	98	KJ603242	Epsilon proteobacterium endosymbiont of Lamellibrachia satsuma clone KB45B-H19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	JN256003	Uncultured epsilon proteobacterium clone Contig_0363__x2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

					98	AB842290	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence,
					98	JN874209	Uncultured bacterium clone RESET_28E04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					98	AB611185	Uncultured epsilon proteobacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: HTM871W-B68.
denovo45715	1,01	2,13	1,90	0,27	98	LT855317	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium partial 16S rRNA gene, clone SP_LB_45.
					97	FJ497375	Uncultured epsilon proteobacterium clone VS_CL-124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					97	FR797959	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SE6R20LBbA25.
					97	FN562827	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone aH8.
denovo16223	2,06	2,53	2,12	1,82	97	KP896632	Uncultured bacterium clone Tams16_9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo19306	1,25	1,47	2,59	1,42	99	HQ894222	Uncultured bacterium clone 95_F04_F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
					99	JN874153	Uncultured bacterium clone RESET_18F12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	JN874152	Uncultured bacterium clone RESET_18F11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	JN874132	Uncultured bacterium clone RESET_18D12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	JN874111	Uncultured bacterium clone RESET_18B12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
denovo23063	1,01	0,51	0,23	5,04	97	JX391370	Uncultured bacterium clone HS034 16S ribosomal RNA gene, partial
denovo23064	1,35	1,50	1,69	0,59	98	KX450476	Tenacibaculum sp. RA3-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					97	HQ726894	Uncultured Tenacibaculum sp. clone T-F10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo28676	3,10	2,13	2,61	1,95	100	FR670356	Uncultured alpha proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone LSmAt.B09.
					99	JN874128	Uncultured bacterium clone RESET_18D08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					99	KT257782	Uncultured bacterium clone Tica9Exp_3A 16S ribosomal RNA gene,
					99	KC682594	Uncultured bacterium clone TuiMs_D10 16S ribosomal RNA gene,
					99	JN874150	Uncultured bacterium clone RESET_18F08 16S ribosomal RNA gene,
denovo35361	6,49	9,97	8,19	6,05	100	AY279062	Uncultured bacterium clone CS031 16S ribosomal RNA gene, partial
					100	AY225614	Uncultured epsilon proteobacterium clone AT-cs3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					100	AY225625	Uncultured epsilon proteobacterium clone AT-cs7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					100	AB013260	Uncultured epsilon proteobacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: NKB8.
					100	KF439002	Bacterium episybiont of Kiwa sp. clone ARB_FAF7118E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo41367	4,56	2,33	1,47	5,67	98	DQ228581	Uncultured bacterium clone LC1149b9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
					97	FR839051	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone A26R.
					97	FR797955	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SE6R19LBbB31.
					97	FR797945	Uncultured epsilon proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SE6J13ScbB58.
					97	FM203395	Epsilon proteobacterium ectosymbiont of Rimicaris exoculata partial 16S rRNA gene, clone LOG_283/7-4_F1.
denovo44322	1,28	0,35	0,90	0,44	99	FM863751	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone T10sul.
					98	HQ894170	Uncultured bacterium clone 38_B09_F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
denovo44535	2,28	3,51	1,93	6,65	98	FN562908	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone bH5.
					97	AB611327	Uncultured Bacteroidetes bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: HTM1036Mw-B27.

Table 3 : OTUs with high similarity to symbiont sequences found on filters from BioBaz.Filters. Numbers correspond to % of the total read.

OTU	sea water 1	sea water 2	NaHCO3 + NA2S 1	NaHCO3 + NA2S 2	Ident	Accession	description
denovo260	0	0	0,116795	0	99,7	gi 219968135 emb FM244838.1	Intranuclear bacterium of Bathymodiolus spp. partial 16S rRNA gene, isolated from the Gulf of Mexico, Mississippi canyon cold seep
denovo339	0,297619	0	0,186872	5,962733	99,3	KU573846.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 346 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (epibiont bathy)
denovo608	0,276361	0,117601	3,293623	2,111801	99,3	AY235677.1	Bathymodiolus puteoserpentis thioautotrophic gill symbiont 16S-23S ribosomal RNA operon, partial sequence
denovo669	0,021259	0,0392	0	0,124224	99,1	AM083950.1	Methanotrophic endosymbiont of Bathymodiolus azoricus (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-10-149

Table 4 : OTUs with high similarity to symbiont sequences found on filters from BICOSE. Numbers correspond to % of the total read.

OTU	Sea water	Methane	NaHCO3	NaHCO3 + NA2S	Ident	Accession	description
denovo26697	0,0001	0	4,58E-05	9,13E-05	100	FM162193.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Wideawake hydrothermal vent field
denovo21774	0,003	0,0004	0,004	0,006	100	FM162188.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Logatchev hydrothermal vent field, IRINA II site
denovo32336	0,009	0,005	0,005	0,0002	100	FM162186.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Lilliput hydrothermal vent field, Main Lilliput site
denovo44605	0,0001	3,35E-05	0	0	100	KU573879.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
denovo15358	0	0,0002	0	0	100	KU573879.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
denovo44070	0,002	0	0,009	0	100	KU644657.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone D0031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
denovo9459	0,003	0,003	0	0	100	LN871183.2	Bathymodiolus azoricus thioautotrophic gill symbiont partial 16S rRNA gene, isolate BazSymB
denovo10116	0	0,000101	0	0	100	U29163.1	Mussel thioautotrophic gill symbiont MAR1 16S ribosomal RNA, complete sequence
denovo45602	0,02	0,02	0,02	0	100	LN871183.2	Bathymodiolus azoricus thioautotrophic gill symbiont partial 16S rRNA gene, isolate BazSymB
denovo21247	0,125	0,8	0,2	1,00	100	AY951931.1	Bathymodiolus azoricus thioautotrophic gill symbiont 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
denovo35623	0,0008	0,003	0	0,003	100	AM083951.1	Methanotrophic endosymbiont of Bathymodiolus azoricus (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-3-154
denovo9162	0	0	0,003	0	100	AM083967.1	Methanotrophic endosymbiont of Bathymodiolus azoricus (Menez Gwen) associated sequence partial 16S rRNA gene, clone aMG-5-160
denovo36232	0	0,0001	0	0	100	AY951932.1	Methanotrophic bacterial endosymbiont of Bathymodiolus azoricus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

## Bibliography

- Altschul S. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389–3402.
- Assié A, Borowski C, van der Heijden K, Raggi L, Geier B, Leisch N, Schimak MP, Dubilier N, Petersen JM. 2016. A specific and widespread association between deep-sea *Bathymodiolus* mussels and a novel family of Epsilonproteobacteria: Epsilonproteobacterial epibionts of *Bathymodiolus*. *Environmental Microbiology Reports* **8**: 805–813.
- Barros I, Mendes S, Rosa D, Serrão Santos R, Bettencourt R. 2016. *Vibrio diabolicus* immunomodulatory effects on *Bathymodiolus azoricus* during long-term acclimatization at atmospheric pressure. *Journal of Aquaculture Research & Development* **7**.
- Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde JL, Figueras MJ. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs: *Vibrio spp.*, bivalve molluscs, pathogens. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 34–43.
- Bowman JP. 1998. *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1037–1041.
- Brissac T, Gros O, Merçot H. 2009. Lack of endosymbiont release by two Lucinidae (Bivalvia) of the genus *Codakia*: consequences for symbiotic relationships: Endosymbiont release in *Codakia*? *FEMS Microbiology Ecology* **67**: 261–267.
- Cambon-Bonavita M-A. 2014. BICOSE cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**: 335.
- Cavanaugh CM, Wirsén CO, Jannasch HW. 1992. Evidence for methylotrophic symbionts in a hydrothermal vent mussel (Bivalvia: Mytilidae) from the Mid-Atlantic Ridge. *Applied and environmental microbiology* **58**: 3799–3803.
- Cosel R von, Métivier B, Hashimoto J. 1994. Three new species of *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents in the Lau Basin and the north Fiji Basin, western Pacific, and the Snake Pit area, Mid-Atlantic Ridge. *The Veliger* **37**: 374–392.
- Cosel R von, Comtet T, Krylova EM. 1999. *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *The Veliger* **42**: 218–248.
- Crépeau V, Cambon Bonavita M-A, Lesongeur F, Randrianalivelo H, Sarradin P-M, Sarrazin J, Godfroy A. 2011. Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field: Diversity and function in Lucky Strike mats. *FEMS Microbiology Ecology* **76**: 524–540.
- Distel DL, Cavanaugh CM. 1994. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *Journal of bacteriology* **176**: 1932–1938.

- Duperron S, Quiles A, Szafranski KM, Léger N, Shillito B. 2016. Estimating symbiont abundances and gill surface areas in specimens of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus puteoserpentis* maintained in pressure vessels. *Frontiers in Marine Science* **3**: 1–12.
- Durand L, Roumagnac M, Cueff-Gauchard V, Jan C, Guri M, Tessier C, Haond M, Crassous P, Zbinden M, Arnaud-Haond S, et al. 2015. Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* resident gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites (G King, Ed). *FEMS Microbiology Ecology* **91**: fiv101.
- Faure B, Jollivet D, Tanguy A, Bonhomme F, Bierne N. 2009. Speciation in the deep sea: Multi-locus analysis of divergence and gene flow between two hybridizing species of hydrothermal vent mussels (CR McClain, Ed). *PLoS ONE* **4**: e6485.
- Fiala-Medioni A, McKiness ZP, Dando PR, Boulegue J, Mariotti A, Alayse A-M, Robinson JJ, Cavanaugh CM. 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. *Marine Biology* **141**: 1035–1043.
- Fisher CR, Brooks JM, Vodenichar JS, Zande JM, Childress JJ, others. 1993. The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *Marine Ecology* **14**: 277–289.
- Häcker G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* **301**: 5–17.
- 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*. *The ISME Journal* **2**: 284–292.
- 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*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **318**: 99–110.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**: 239–257.
- Klose J, Polz MF, Wagner M, Schimak MP, Gollner S, Bright M. 2015. Endosymbionts escape dead hydrothermal vent tubeworms to enrich the free-living population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 11300–11305.
- Lallier F. 2013. BIOBAZ 2013 cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Laming SR, Duperron S, Gaudron SM, Hilário A, Cunha MR. 2015. Adapted to change: The rapid development of symbiosis in newly settled, fast-maturing chemosymbiotic mussels in the deep sea. *Marine Environmental Research* **112**: 100–112.
- Lane DJ. 1991. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York.
- Lesser MP. 2004. Experimental biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **300**: 217–252.
- Lopez-Garcia P, Duperron S, Philippot P, Foriel J, Susini J, Moreira D. 2003. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* **5**: 961–976.

- Lorion J, Kiel S, Faure B, Kawato M, Ho SYW, Marshall B, Tsuchida S, Miyazaki J-I, Fujiwara Y. 2013. Adaptive radiation of chemosymbiotic deep-sea mussels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20131243–20131243.
- Nyholm SV, McFall-Ngai M. 2004. The winnowing: establishing the squid–vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 632–642.
- O’Mullan GD, Maas PAY, Lutz RA, Vrijenhoek RC. 2001. A hybrid zone between hydrothermal vent mussels (Bivalvia: Mytilidae) from the Mid-Atlantic Ridge. *Molecular Ecology* **10**: 2819–2831.
- Perez S. 2006. Nitric oxide and cnidarian bleaching: an eviction notice mediates breakdown of a symbiosis. *Journal of Experimental Biology* **209**: 2804–2810.
- Petersen JM, Zielinski FU, Pape T, Seifert R, Moraru C, Amann R, Hourdez S, Girguis PR, Wankel SD, Barbe V, et al. 2011. Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* **476**: 176–180.
- Piquet B, Shillito B, Lallier FH, Duperron S, Andersen AC. 2018. High rates of apoptosis visualised in the symbiont-bearing gills of deep-sea chemosynthetic mussels (genus *Bathymodiolus*). *Submitted*.
- Quast C, Priesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**: D590–D596.
- Rajasabapathy R, Mohandass C, Colaco A, Dastager SG, Santos RS, Meena RM. 2014. Culturable bacterial phylogeny from a shallow water hydrothermal vent of Espalamaca (Faial, Azores) reveals a variety of novel taxa. *CURRENT SCIENCE* **106**: 12.
- Riou V, Halary S, Duperron S, Bouillon S, Elskens M, Bettencourt R, Santos RS, Dehairs F, Colaço A. 2008. Influence of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>S availability on symbiont distribution, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences* **5**: 1681–1691.
- Salerno JL, Macko SA, Hallam SJ, Bright M, Won Y-J, McKiness Z, Van Dover CL. 2005. Characterization of symbiont populations in life-history stages of mussels from chemosynthetic environments. *The Biological Bulletin* **208**: 145–155.
- Shillito B, Hamel G, Duchi C, Cottin D, Sarrazin J, Sarradin P-M, Ravaux J, Gaill F. 2008. Live capture of megafauna from 2300m depth, using a newly designed Pressurized Recovery Device. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **55**: 881–889.
- Shillito B, Gaill F, Ravaux J. 2014. The IPOCAMP pressure incubator for deep-sea fauna. *J. Mar. Sci. Technol.* **22**: 97–102.
- Szafranski KM, Deschamps P, Cunha MR, Gaudron SM, Duperron S. 2015a. Colonization of plant substrates at hydrothermal vents and cold seeps in the northeast Atlantic and Mediterranean and occurrence of symbiont-related bacteria. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Szafranski KM, Piquet B, Shillito B, Lallier FH, Duperron S. 2015b. Relative abundances of methane- and sulfur-oxidizing symbionts in gills of the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* under pressure. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **101**: 7–13.

- 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. *The ISME journal* **7**: 1244–1247.
- Wentrup C, Wendeberg A, Schimak M, Borowski C, Dubilier N. 2014. Forever competent: deep-sea bivalves are colonized by their chemosynthetic symbionts throughout their lifetime: Symbiont colonization in gills of deep-sea bivalves. *Environmental Microbiology* **16**: 3699–3713.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 635–645.
- Zielinski FU, Pernthaler A, Duperron S, Raggi L, Giere O, Borowski C, Dubilier N. 2009. Widespread occurrence of an intranuclear bacterial parasite in vent and seep bathymodiolin mussels. *Environmental Microbiology* **11**: 1150–1167.



## Supplementary Table

Supplementary table 1 : Homemade database of mussel symbiont sequences used to identify potential symbiont sequences

Accession	description
AM083974.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Rainbow) partial 16S rRNA gene, clone aRB-2-4
AM083971.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-5-159
AM083986.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-2-7
AM083985.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-2-5
AM083984.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-3-40
AM083980.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG1-21
AM083978.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-1-19
AM083969.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-3-157
AM083983.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-3-32
AM083979.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-2-2
AM083968.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-10-153
AM083970.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-3-55
AM083972.1	Thiotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Lucky Strike) partial 16S rRNA gene, clone aLS-4-3
AY951931.1	<i>Bathymodiolus azoricus</i> thioautotrophic gill symbiont 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AY235676.1	<i>Bathymodiolus azoricus</i> thioautotrophic gill symbiont 16S-23S ribosomal RNA operon, partial sequence
AY235677.1	<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> thioautotrophic gill symbiont 16S-23S ribosomal RNA operon, partial sequence
AY235679.1	<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> thioautotrophic gill symbiont clone sym-pu1 16S-23S ribosomal RNA operon, partial sequence
U29163.1	Mussel thioautotrophic gill symbiont MAR1 16S ribosomal RNA, complete sequence
LN871183.2	<i>Bathymodiolus azoricus</i> thioautotrophic gill symbiont partial 16S rRNA gene, isolate BazSymB
AM083950.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-10-149
AM083957.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-4-15
AM083955.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-2-1
AM083953.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Lucky Strike) partial 16S rRNA gene, clone aLS-4-6
AM083964.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-3-34

AM083963.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-3-33
AM083960.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-1-22
AM083958.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-4-17
AM083956.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-4-12
AM083952.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-5-155
AM083951.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Menez Gwen) partial 16S rRNA gene, clone aMG-3-154
AM083966.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> (Logatchev) partial 16S rRNA gene, clone pLOG-2-9
AM083954.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Rainbow) partial 16S rRNA gene, clone aRB-1-4
AY951932.1	Methanotrophic bacterial endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
U29164.1	Mussel methanotrophic gill symbiont MAR2 16S ribosomal RNA, complete sequence
AM083967.1	Methanotrophic endosymbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (Menez Gwen) associated sequence partial 16S rRNA gene, clone aMG-5-160
KU573846.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 346 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644652.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 1600J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573851.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 896 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573850.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 888 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573849.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 879 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573847.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 368 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573852.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 353 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644658.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone D0030 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644654.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 864B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644647.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 1600I 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573869.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 640-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573868.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 640-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573867.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-6-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573865.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-5-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573864.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-5-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573863.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573862.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-4-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

KU573861.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573859.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573858.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573856.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-1-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573855.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573854.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573853.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573848.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 379 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644655.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone C1632 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644651.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone M26-70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644649.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone M21-35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644648.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone M6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644646.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 1056C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573877.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 27-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573866.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-6-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573860.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573857.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone E1-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573878.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 640-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644660.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone C1633 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573876.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 2859 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573875.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 2857 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573874.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 2845 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573870.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573871.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644657.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone D0031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644650.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone M22-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU573879.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644656.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone D0032 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

KU644659.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone C1634 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
KU644653.1	Uncultured Epsilonproteobacteria bacterium clone 864A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
FM162189.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Logatchev hydrothermal vent field, IRINA II site
FM162188.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Logatchev hydrothermal vent field, IRINA II site
FM162187.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Menez Gwen hydrothermal vent field
FM162186.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Lilliput hydrothermal vent field, Main Lilliput site
FM162192.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Wideawake hydrothermal vent field
FM162191.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Wideawake hydrothermal vent field
FM162190.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Wideawake hydrothermal vent field
FM162193.1	Candidatus Endonucleobacter bathymodioli partial 16S rRNA gene, isolated from Mid-Atlantic Ridge, Wideawake hydrothermal vent field

#### 4.2.2 Relargage des symbiotes lors de stress thermiques et lors de la mort de l'hôte

Les expériences de relargage menées au cours des campagnes BioBaz et BICOSE donnent une première indication intéressante quant au relargage de symbiotes par les moules vivantes. Lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 (voir partie 2.2.1.4), des spécimens de *Bathymodiolus azoricus* du Lucky Strike (1690m de profondeur) ont été maintenus dans de l'eau de mer filtré à 0.22 $\mu$ m et cette eau a été filtrée dans le but de chercher la trace possible des symbiotes. Comme dans la partie précédente, des expérimentations avec des sulfures et des sources de carbone ont été réalisées avec les mêmes concentrations. Toutefois deux différences importantes sont à signaler : le temps de balnéation a été augmenté de 5h à 48h d'une part, et les expériences n'ont pas été réalisées en aquariums pressurisés, non disponibles lors de cette campagne. Ces balnéations sont celles décrites dans la partie 3.1.2. A l'issue des incubations, l'eau des bocaux a été filtrée à 0.22 $\mu$ m et chaque filtre a été séparé en deux parties. L'une a été fixée au PFA en vue de réaliser des essais de FISH et l'autre conservée dans de l'azote liquide pour l'analyse de l'ADN.

Deux expériences de stress thermique ont en outre été réalisées. Les moules ont été maintenues dans de l'eau de mer filtrée à 4°C, puis la température a été montée progressivement jusqu'à 25°C en 2h, et stabilisée pendant 1h. Lors de cette expérience, les moules n'ont pas supporté la température et se sont ouvertes sans sortir leurs siphons ni leur pied. Dans la deuxième expérience, la température a été montée de 4 à 21°C en 2h et maintenue entre 21 et 22°C pendant 1h. Les moules ont eu la même réaction, laissant penser qu'une température supérieure à 20°C durant plusieurs heures est néfaste voire mortelle pour les *Bathymodiolus azoricus*. Cette manipulation avait pour but de voir si en cas de stress thermique prolongé, les moules pouvaient relarguer leurs symbiotes, comme le font les coraux lors des hausses de température. De la même manière, l'eau a été filtrée et le filtre fixé pour FISH et analyse ADN.

Afin de déterminer si les bactéries endosymbiotiques relarguées par leur hôte sont capables de survivre voir de croître comme le font les symbiotes de l'annélide tubicole hydrothermal *Riftia pachyptila* (Harmer *et al.*, 2008; Klose *et al.*, 2015), une expérimentation mimant la mort de la branchie a été effectuée. Des branchies ont été extraites de moules *Bathymodiolus azoricus* et placées dans une boîte de pétri tapissée de lames histologiques SuperFrost Plus adhésives (fournisseur VWR), qui constituent des substrats possibles de colonisation pour les bactéries. Durant les incubations de 48 heures au total, deux lames ont été prélevées à différents moments (2h, 8h, 18h et 48h) et fixées au PFA pour réaliser des expériences de FISH. Cette expérience

a été réalisée 3 fois, une fois avec de l'EDMF à 0.22µm avec du BrdU, une autre avec du EdU et une dernière avec du BrdU, du sulfure et une source de carbone (voir partie 3.1.3 pour plus de détails).

Lors de cette campagne, des échantillons de l'eau de mer du fond (à distance des sources hydrothermales), ainsi que de l'eau de la moulière (à proximité des moules *i.e.* à quelques centimètres des coquilles) ont été collectés, filtrés et fixés comme décrit précédemment. Ces deux collectes d'eau constituent des témoins pour comparer la composition des communautés bactériennes dans l'eau de mer du fond et l'eau de la moulière et tester la présence de symbiotes près des moules.

Tableau 8 : Tableau listant les filtres réalisés lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017. Chaque ligne correspond à un filtre. La première colonne, la provenance des moules de l'expérience. La deuxième colonne, le nombre de jours depuis leur remontée donc depuis combien de jours les moules commencent à perdre leurs symbiotes. La troisième colonne indique le milieu dans lequel les moules ou les branchies ont été gardées pendant l'expérience. Et la dernière colonne, le temps que les moules ou les branchies ont passé dans le milieu décrit colonne 3, avant que l'eau ne soit filtrée. En gras, l'expérience menée sur branchie isolée dont les résultats sont présentés dans la suite du paragraphe.

Site	Conditions des moules	Expérience	Temps incubation
<b>Lucky Strike</b>	0 jour de jeûne/remontée	Eau de mer	48h
<b>Lucky Strike</b>	0 jour de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU	48h
<b>Lucky Strike</b>	0 jour de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU + Sulfure et bicarbonate	48h
<b>Lucky Strike</b>	2 jours de jeûne/remontée	Eau de mer	48h
<b>Lucky Strike</b>	2 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU	48h
<b>Lucky Strike</b>	2 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU + Sulfure et bicarbonate	48h
<b>Lucky Strike</b>	3 jours de jeûne/remontée	Eau de mer	48h
<b>Lucky Strike</b>	3 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU	48h
<b>Lucky Strike</b>	3 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU + Sulfure et bicarbonate	48h
<b>Lucky Strike</b>	6 jours de jeûne/remontée	Eau de mer	48h
<b>Lucky Strike</b>	6 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU	48h
<b>Lucky Strike</b>	6 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU + Sulfure et bicarbonate	48h
<b>Lucky Strike</b>	10 jours de jeûne/remontée	Eau de mer	48h

Site	Conditions des moules	Expérience	Temps incubation
Lucky Strike	10 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU	48h
Lucky Strike	10 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU + Sulfure et bicarbonate	48h
Lucky Strike	0 jours de jeûne/remontée	Eau de mer	4 jours
Lucky Strike	Branchie isolée 0 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU	48h
Lucky Strike	Branchie isolée 0 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + BrdU + Sulfure et bicarbonate	48h
Lucky Strike	Branchie isolée 0 jours de jeûne/remontée	Eau de mer + EdU	48h
Lucky Strike	0 jours de jeûne/remontée	Stress thermique 25°C	3h
Lucky Strike	0 jours de jeûne/remontée	Stress thermique 21°C	3h
Lucky Strike	∅	Eau du fond	∅
Lucky Strike	∅	Eau de la moulière	∅
Lucky Strike	∅	Eau de la moulière	∅

Actuellement, l'ADN des 24 filtres réalisés au cours de la campagne a été extrait et doit être envoyé pour l'étape de métabarcoding (séquençage à haut débit d'une région hypervariable de l'ARNr 16S bactérien) et les symbiotes doivent être recherchés en qPCR comme cela a été fait pour l'étude précédente.

Les seuls résultats obtenus concernent les lames histologiques déployées lors des expérimentations avec les branchies isolées, et qui ont été obtenus à l'aide de la méthode FISH. Ils sont présentés ci dessous.

## Méthode

Les lames histologiques déployées dans les expériences d'incubation de branchie isolée ont été collectées au bout de 48h, puis réhydratées de la même manière que décrit dans la partie 2.3.1. Les hybridations *in situ* des lames ont été réalisées dans un tampon d'hybridation composé de NaCl (1.08M), Tris-HCl (24mM), 0.01% SDS (Sodium Dodécyl-Sulfate), et 30% de formamide dans de l'eau distillée. Ce tampon permet l'hybridation spécifique des sondes

complémentaires à l'ARNr 16S bactérien empêchent l'hybridation non spécifique. Six sondes différentes ont été utilisées, chacune ciblant plus ou moins spécifiquement divers groupes bactériens : EUB338 est une sonde généraliste pour les eubactéries (Amann *et al.*, 1990) ; EPSY549 cible les *Epsilonproteobacteria*, et GAM42 cible les *Gammaproteobacteria* (Manz *et al.*, 1992), deux groupes abondants autour des sources hydrothermales. Deux sondes spécifiques des symbiotes de bathymodiales ont été utilisées pour tester la présence des symbiotes sur les lames, les sondes Imed M-138 pour les bactéries méthanotrophes (Duperron *et al.*, 2008) et Bang T-642 pour les bactéries sulfo-oxydantes (Duperron *et al.*, 2005).

Tableau 9 : Sondes couplées à un fluorochrome utilisées pour le marquage des bactéries lors de la méthode FISH.

Nom de la sonde	Séquence (5'→3')	Références
<b>EUB 338</b>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(Amann <i>et al.</i> , 1990)
<b>GAM 42</b>	GCCTTCCCACATCGTTT	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
<b>EPSY 549</b>	CAGTGATTCCGAGTAACG	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
<b>Imed M-138</b>	ACCATGTTGTCCCCACTAA	(Duperron <i>et al.</i> , 2008)
<b>Bang T-642</b>	CCTATACTCTAGCTTGCCAG	(Duperron <i>et al.</i> , 2005)

100ng de chaque sonde ont été mélangés avec le tampon d'hybridation pour un volume final de 30µl qui a été déposé sur chaque spot. Pour les marquages des sondes, 2 fluorochromes différents ont été utilisés. La cyanine 3 (Cy3) (rouge) et l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (vert) qui est un dérivé de la fluorescéine. Sur chaque lame, 3 zones ont été délimitées. Sur le premier spot est déposé la sonde Eub 338 FITC et la sonde EPSY549 Cy3. Sur le deuxième spot, la sonde Eub 338 FITC et la sonde GAM42 Cy3 et sur le dernier spot, les sondes Imed M-138 FITC et Bang T-642 Cy3.

Les lames ont été ensuite incubées dans un four d'hybridation à 46°C pendant 3h, puis plongées dans un tampon de rinçage contenant du NaCl (1.02mM), du TrisHCl (20mM), de l'EDTA (5mM) et 0.01% de SDS dans de l'eau distillée, pour un bain à 48°C pendant 15min afin de décrocher les sondes qui ne sont pas hybridées avec leurs séquences complémentaires.

Les lames sont enfin couvertes d'un milieu de montage composé du photoprotecteur « SlowFade » (Invitrogen) mélangé à du 4'6'-Diamidino-2-phényl-indole (DAPI) qui permet de visualiser l'ADN avant ajout d'une lamelle. Les lames ont été observées avec un microscope



confocal Leica SP5 (Leica, Germany). Les images acquises ont été ensuite analysées grâce au logiciel imageJ (Abramoff 2004).

## Résultats et discussion

Au cours des expérimentations, les branchies isolées n'ont pas changé d'aspect général au bout de 48h, mais dans l'eau on pouvait voir de nombreux tout petits grains de la même couleur que les branchies. Il pourrait s'agir de cellules branchiales qui se sont détachées de la branchie.

Deux lames ont été testées provenant de la même incubation, celle d'une branchie nue dans de l'eau de mer contenant  $3\mu\text{g/L}^{-1}$  de BrdU. Sur la lame prélevée au bout de 2h, le DAPI et les sondes ne révèlent aucun signal, suggérant l'absence ou la grande rareté des bactéries capables de s'établir à la surface des lames. La seconde lame prélevée au bout de 48h a par contre révélé de nombreux signaux DAPI dont une bonne partie a une forme de bâtonnet d'environ  $2\mu\text{m}$  de long. Ces bâtonnets forment de nombreux groupes sur la lame. Sur les lames, on observe souvent des noyaux de grande taille probablement issus d'une cellule animale. Le marquage avec la Sonde EUB, permet de confirmer que ces bâtonnets sont bien des bactéries, tandis que les « noyaux » ne prennent pas de signal (figure 51). La sonde EPSY549 ne semble rien marquer sur la lame, alors que la sonde GAM42 marque tous les bâtonnets (figure 51 et 52). Ces bâtonnets sont donc des *Gammaproteobacteria*. L'utilisation des sondes spécifiques aux symbiotes de bathymodioles a permis de préciser leur affiliation. La sonde marquant les symbiotes méthanotrophes des bathymodioles s'accroche en effet sur la majorité de ces bactéries (figure 53), mais pas sur toutes les bactéries.

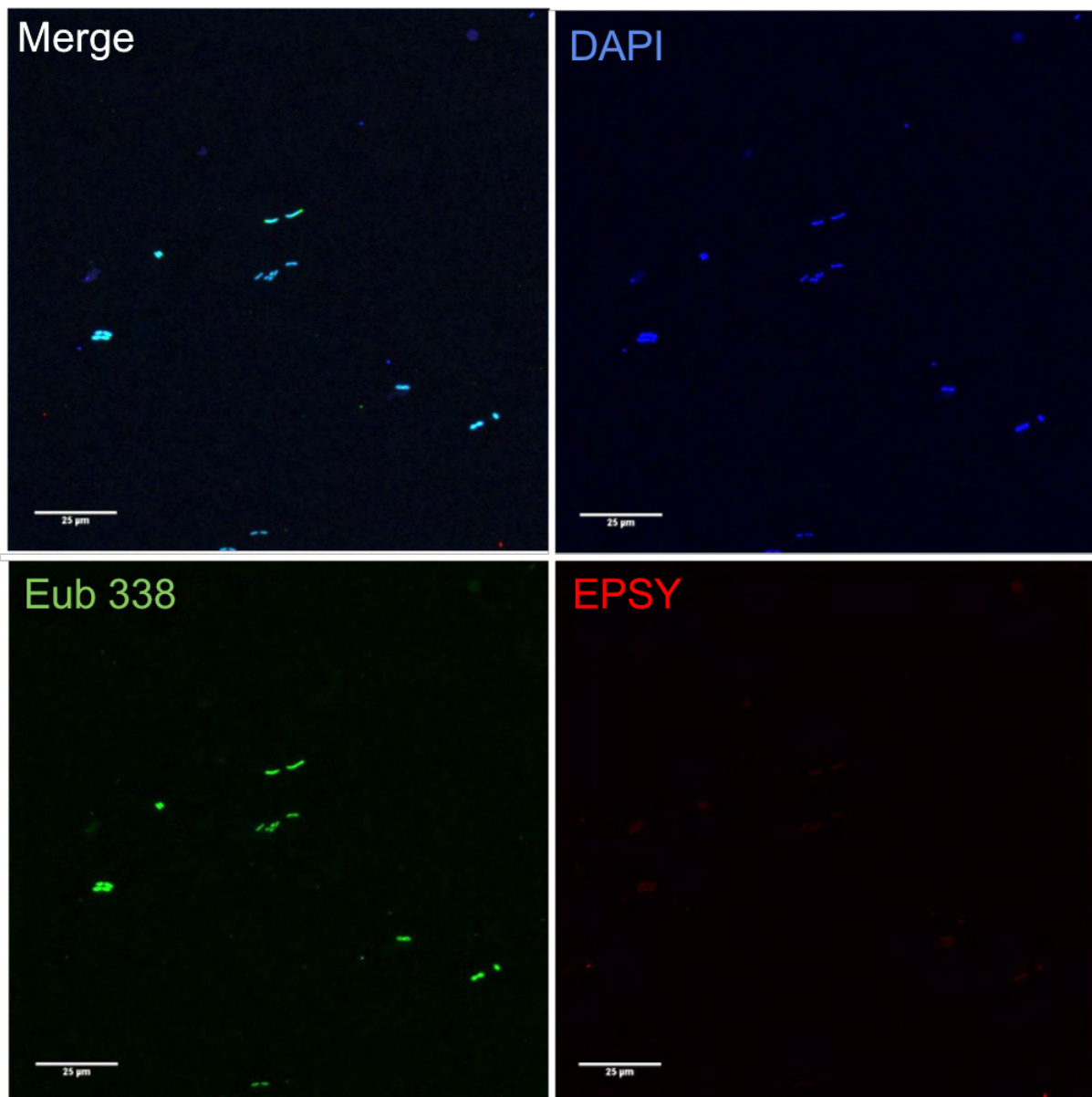


Figure 51 : Photo prise en microscopie confocale d'une lame placée 48h dans une boîte de Pétri en présence d'une branchie isolée de *Bathymodiolus azoricus* du site Lucky Strike. En haut à gauche la superposition des 3 canaux. En haut à droite, le marquage DAPI se fixant sur l'ADN. En bas à gauche, la sonde EUB338 marquant toutes les eubactéries. En bas à droite, la sonde EPSY549 marquant les *Epsilonproteobacteria*, non présente sur la lame. Barre d'échelle : 25µm.

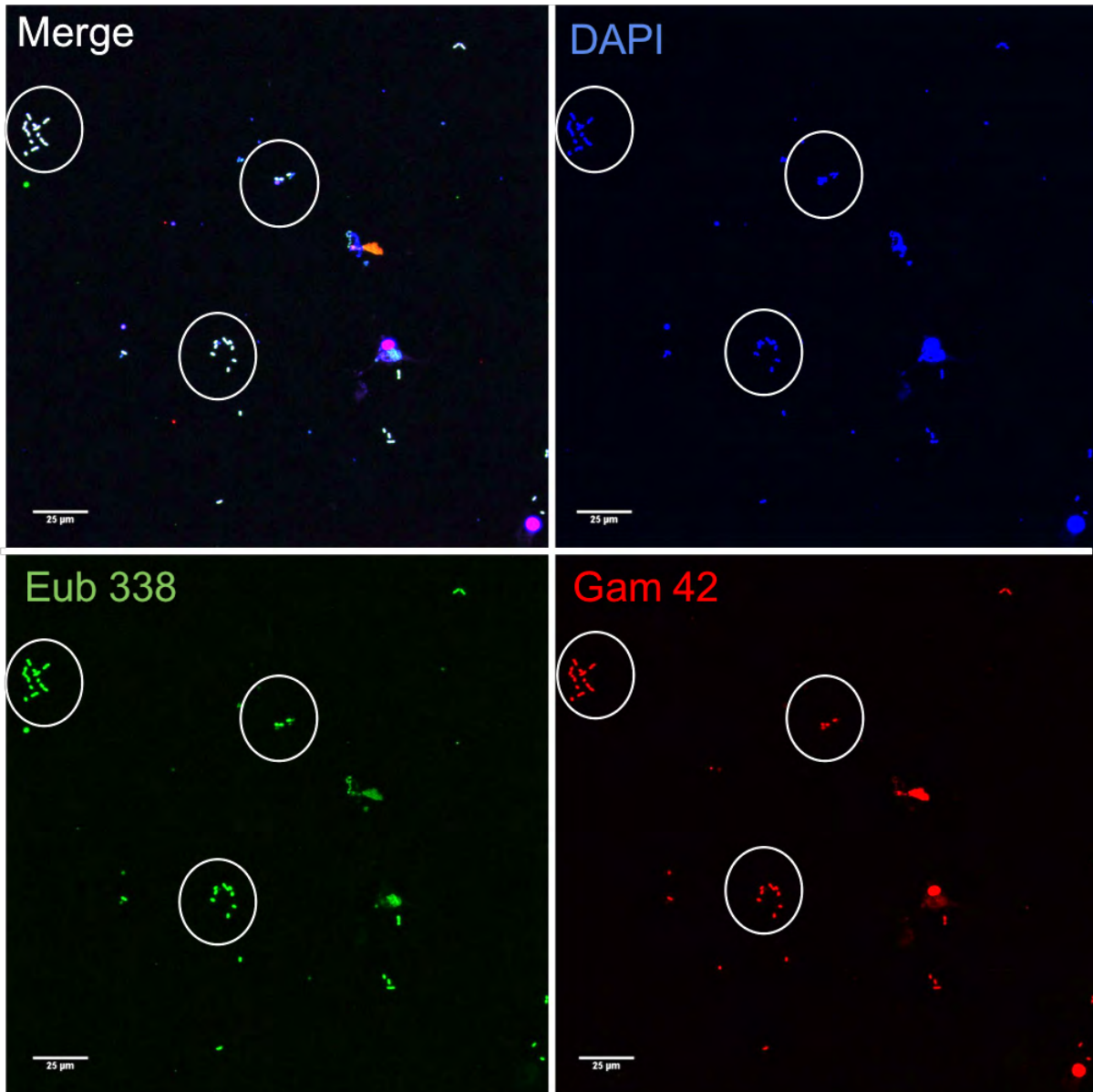


Figure 52 : Photo prise en microscopie confocale d'une lame placée 48h dans une boîte de Pétri en présence d'une branchie isolée de *Bathymodiolus azoricus* du site Lucky Strike. En haut à gauche la superposition des 3 canaux. En haut à droite, le marquage DAPI se fixant sur l'ADN. En bas à gauche, la sonde EUB338 marquant toutes les eubactéries. En bas à droite, la sonde GAM42 marquant les *Gammaproteobacteria*, très abondantes. Barre d'échelle : 25µm.

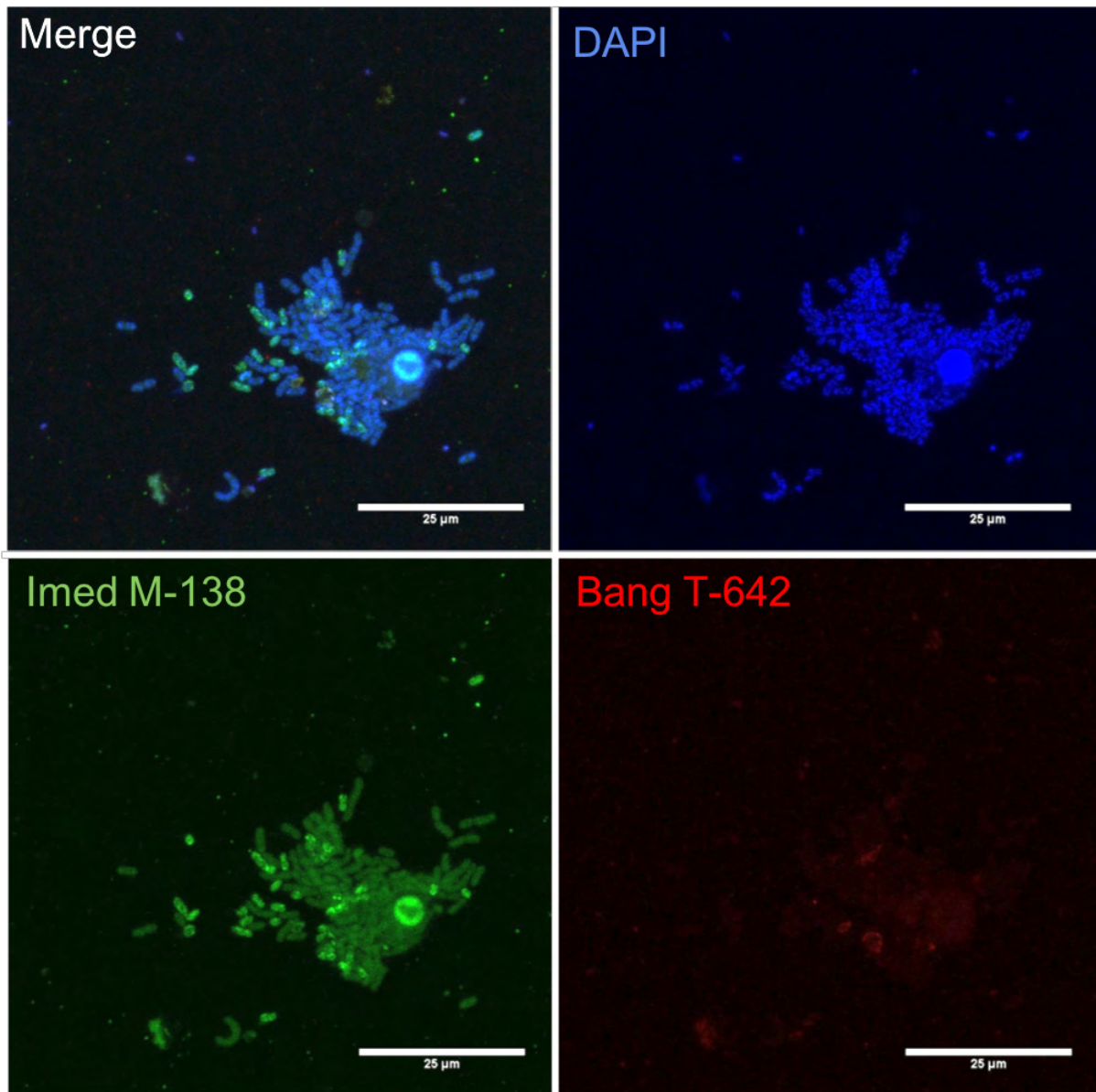


Figure 53 : Photo prise en microscopie confocale d'une lame placée 48h dans une boîte de Pétri en présence d'une branchie isolée de *Bathymodiolus azoricus* du site Lucky Strike. En haut à gauche la superposition des 3 canaux. En haut à droite, un marquage DAPI se fixant sur l'ADN. En bas à gauche, la sonde ImedM138 marquant les bactéries symbiotiques méthanotrophes de bathymodiales, abondantes et reconnaissables à leur forme de « donut » (Duperron *et al.*, 2005). En bas à droite, la sonde BangT642 marquant les bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes de bathymodiales, apparemment absentes. Barre d'échelle : 25µm.

Il semble donc que la majorité des bactéries soient des symbiotes méthanotrophes de bathymodiale. L'eau de mer dans laquelle les incubations ont été réalisées était initialement stérile (filtrée à 0.22µm) tout comme les lames trempées dans de l'éthanol absolu et la boîte de Pétri a été autoclavée afin de la stériliser. On peut donc supposer que les bactéries ne peuvent provenir que de la branchie de bathymodiale. La longueur de ces bâtonnets est située entre 1 et

2µm et cela correspond à la taille des symbiotes méthanotrophes, de même que l'aspect général des bactéries en « donut » avec une zone moins marquée en leur centre (Duperron *et al.*, 2005). Sur les lames, les symbiotes semblent agrégés par paires. Le marquage montrant des zones plus lumineuses dans certaines zones de la bactérie et leur taille qui varie entre 1µm et le double, laisse suspecter que certaines de ces bactéries pourraient être en train de se diviser. Le signal FISH intense montre en tous cas qu'elles sont riches en ribosomes, puisque les sondes s'hybrident à l'ARNr 16S qu'ils contiennent, donc probablement actives (Halary *et al.*, 2008). Tout porte à croire que les bactéries méthanotrophes sont donc capables de quitter le tissu en décomposition de leurs hôtes, de demeurer actives hors de l'hôte, de s'établir sur des surfaces comme celle d'une lame, et de s'y diviser. Même si ces résultats sont préliminaires, ils suggèrent une capacité des symbiotes méthanotrophes à vivre hors de leur hôte, à l'image des *Aliivibrio fischeri* associés à la sépiole *Euprymna scolopes* (Nyholm *et al.*, 2000) et aux symbiotes de *Riftia* qui s'échappent après la mort de leur hôte (Klose *et al.*, 2015). Cette découverte nécessite d'être confirmée en réitérant cette expérience et par la poursuite des analyses. Au contraire, la sonde FISH visant les bactéries sulfo-oxydantes ne semble pas marquer de bactéries sur la lame. Les bactéries sulfo-oxydantes sont 3 fois plus petites que les méthanotrophes, ce qui limite peut-être leur détection. Il se pourrait aussi qu'elles ne colonisent pas les surfaces, ou encore qu'elles soient inactives ou en dormance en dehors de leur hôte, ce qui expliquerait leur détection à partir de l'ADN (voir partie 4.1.1), mais pas en FISH (peu de ribosomes). L'étude récente de génomes de symbiotes sulfo-oxdants de bathymodiales suggère d'ailleurs un génome réduit et l'incapacité à vivre activement en dehors des cellules branchiales (Ponnudurai *et al.*, 2016). Ces résultats préliminaires laissent supposer que les capacités des deux principaux types de symbiotes à s'échapper d'un hôte en décomposition et à vivre en dehors de cet hôte pourraient être très différentes.

D'autres lames doivent être encore observées pour confirmer ces premières observations, mais ces premiers résultats semblent montrer un relargage important de symbiotes méthanotrophes. D'autres marquages tels que l'anticorps FtsZ pourront être utilisés sur ces filtres pour étudier plus précisément la possible multiplication des bactéries. Les milieux d'incubation contenaient du BrdU et de l'EdU qui pourront être révélés au niveau des bactéries (cela a été fait sur les hôtes, voir partie 3.1.2 et 3.1.3.) afin de confirmer l'hypothèse d'une multiplication des bactéries méthanotrophes en dehors de l'hôte.

### 4.3 SUIVI DE LA PERTE DES SYMBIOTES ET MISE EN PLACE DE LA BRANCHIE APOSYMBIOTIQUE

Lorsque les moules sont éloignées de leur site d'origine et donc privées de méthane et de sulfure, les branchies perdent leurs symbiotes. De nombreuses techniques ont été utilisées afin de suivre cette dépuración : la microscopie électronique (Raulfs *et al.*, 2004; Kádár *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2017), la RT qPCR (Détrée *et al.*, 2016) et la méthode FISH (Riou *et al.*, 2010b). En général, une seule méthode est utilisée et les temps entre les observations sont très espacés. Ces méthodes sont utilisées pour démontrer la présence ou l'absence des symbiotes plutôt que pour suivre la dynamique de la dépuración. C'est pour cette raison qu'elles sont en général utilisées à des moments très éloignés alors que la perte des symbiotes se fait très rapidement. Dans ce chapitre, nous allons observer la perte des symbiotes chez *Bathymodiolus azoricus* à différentes échelles de temps, en microscopie à fluorescence grâce à la méthode FISH et en MET. Des observations ont été effectuées à des temps rapprochés au début de la dépuración afin de mieux suivre les processus tissulaires et intracellulaires lors de la perte des symbiotes. A l'issue de temps plus longs, nous avons pu suivre la mise en place d'une nouvelle organisation de la branchie désormais dépourvue de symbiotes. Une étude utilisant les signatures isotopiques a démontré que les bathymodiales sont mixotrophes (Riou *et al.*, 2010b). Elle suggère que la nutrition par suspensivorie chez *Bathymodiolus azoricus* n'est pas négligeable et qu'elles sont capables de se nourrir de particules en suspension et de matière organique dissoute, en particulier sur les sites les moins profonds (Riou *et al.*, 2010a). Les moules seraient capables de filtrer des microalgues, mais préférentiellement des bactéries (Page *et al.*, 1990, 1991). Les moules *Bathymodiolus childressi* des suintements froids du Golfe du Mexique filtrent ainsi jusqu'à 80% des bactéries présentes dans l'eau (Pile and Young, 1999). Ces expérimentations ont été réalisées sur des animaux soit dans leur milieu naturel, soit tout juste après leur échantillonnage. Nous avons réussi à maintenir des bathymodiales plus de 2 mois sans apport de nourriture, ni de sulfure et ni de méthane, afin d'étudier si les moules sont capables de se passer de leur microbiote, et de quelle manière cela pourrait influencer la structure des différents types cellulaires de la branchie.

#### Matériel et méthodes

Lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 (voir partie 2.2.1.4), des *Bathymodiolus azoricus* des sites Menez Gwen et Lucky Strike ont été remontées et maintenues en aquarium à

4°C contenant de l'eau de mer filtrée à 0.22µm. Les moules du site Lucky Strike ont été maintenues pendant 10 jours. Nous avons réalisé des fixations à bord des deux sites immédiatement à la remontée (témoins de remontée) et au début de la dépuraction aux jours  $t = 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8$  et 10 jours. Celles du site Menez Gwen, au nombre de 1000, ont été ramenées en avion à Océanopolis (Brest). Elles ont été maintenues un mois et demi dans de l'eau de mer à 8°C (+/- 2°C). Puis 200 moules ont été transférées à Roscoff à l'aquarium (RAS). Ces dernières ont été maintenues à la même température qu'à Océanopolis, mais elles ont été nourries avec des microalgues du genre *T-Isochrysis*, une coccolithophycée dont le diamètre est de 4 à 6µm (Kim *et al.*, 2012). Le choix de cette microalgue correspond à la nourriture « standard » donnée aux organismes filtreurs dans les aquariums à Océanopolis, car elle est cultivée en routine dans leur collection, et il en est de même au RAS. En effet, le genre *Isochrysis* est couramment cultivé comme une excellente nourriture pour les larves de bivalves, car très riche en fucoxanthine (Helm *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012). Les moules ont été maintenues à Roscoff du mois de septembre au mois de juin 2018 (voir partie 7.1 de l'annexe portant sur la maintenance à long terme). Sur environ 200 individus, seulement 3 sont morts de cause apparemment naturelle. Les bathymodiales placées dans l'aquarium nous ont surpris par leur activité : dispersion des moules, déplacements constants de la majorité des individus sur l'ensemble des parois de l'aquarium, avec leurs pieds très étirés, leurs siphons ouverts, attestant d'une vitalité qui n'avait apparemment rien de léthargique.

Une branchie a été fixée au PFA de la même manière que décrit dans la partie 3.2, afin de suivre par la méthode FISH la distribution des symbiotes au cours de la dépuraction, à l'échelle d'un filament entier. Des filaments de la partie médiane de l'autre branchie ont été fixés pour la microscopie électronique et ce à différentes étapes de la dépuraction, afin de suivre les mécanismes intracellulaires accompagnant la perte des symbiotes. Pour les moules des deux sites Menez Gwen et Lucky Strike, des filaments de branchies ont été conditionnés dès leur remontée (non pressurisée) et constituent nos témoins du site. Ensuite nous avons refait des fixations après 8 jours de jeûne à bord du bateau du *N/O Pourquoi pas ?*. Pour celles de Menez Gwen, des filaments ont été conditionnés dès leur arrivée en Bretagne à Océanopolis (soit à 9 jours, puis toutes les semaines) et puis finalement au bout d'un long jeûne de 61 jours, avant qu'elles ne soient nourries au *T-Isochrysis*.

## FISH

Pour repérer les symbiotes au cours de la dépuraction, le même protocole que dans la partie 4.2.2 a été utilisé avec les sondes Imed M-138 pour marquer les bactéries méthanotrophes avec le fluochrome FITC, et Bang T-642 pour marquer les bactéries sulfo-oxydantes avec le fluochrome Cy3.

#### Microscopie électronique

Pour suivre la dynamique cellulaire de la dépuraction à l'échelle ultrastructurale en MET, la méthode de fixation, inclusion et coupe a été décrite entièrement dans la partie 3.2.1.

### **Résultats**

Le suivi de la distribution des symbiotes dans les branchies marquées en FISH montre une diminution rapide de la quantité de bactéries (figure 54) sur les deux sites. A partir de 8 jours, on observe une diminution importante de la quantité de bactéries (Fig. 54B) et à partir de 2 semaines, très peu de bactériocytes possèdent encore des symbiotes (Fig.45C) Au bout de deux mois de jeûne, nous ne retrouvons plus aucune trace de symbiotes dans les branchies (Fig. 54D). Il ne semble pas y avoir un type de symbiotes qui disparaisse plus vite de la branchie qu'un autre. Les deux types de symbiotes disparaissent à la même vitesse.



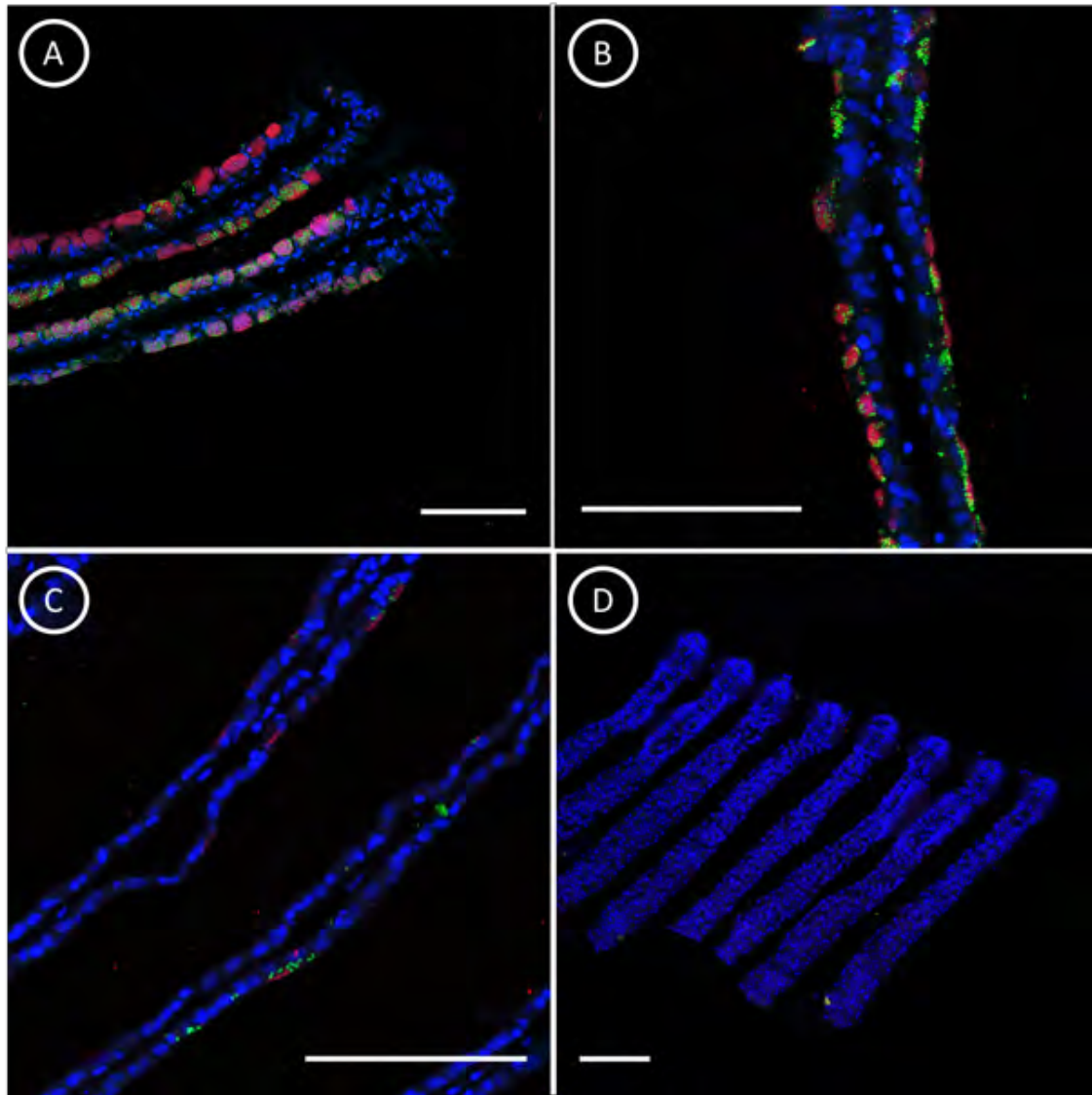


Figure 54 : Photo au microscope confocal des filaments de branchie de *Bathymodiolus azoricus* du site de Menez Gwen. En bleu, on peut voir les noyaux colorés en DAPI, en vert les bactéries méthanotrophes et en rouge les bactéries sulfo-oxydantes. A) T = 0h. B) Après 8 jours de jeûne. C) Après 16 jours de jeûne. D) Après 61 jours de jeûne. (Barre d'échelle = 100 $\mu$ m).

Sur les images en microscopie électronique, chez les individus fixés à la remontée *i.e.* témoins, les bactériocytes possèdent de nombreuses bactéries. La membrane des bactériocytes en contact avec le milieu extérieur possède des microvillosités peu développées (figure 55 A). On observe chez les témoins du site Lucky Strike les deux types de symbiotes dans les mêmes vacuoles des même bactériocytes (figure 55 D). Par contre, dans les vacuoles des individus de Menez Gwen, les symbiotes MOX et SOX sont toujours observés dans des vacuoles différentes d'une même cellule hôte (figure 55 B). Les bactéries situées du côté apical de la cellule sont en général seules dans leur vacuole. La quantité de bactéries à l'intérieur de la vacuole augmente lorsque l'on se dirige vers la lame basale (figure 56).

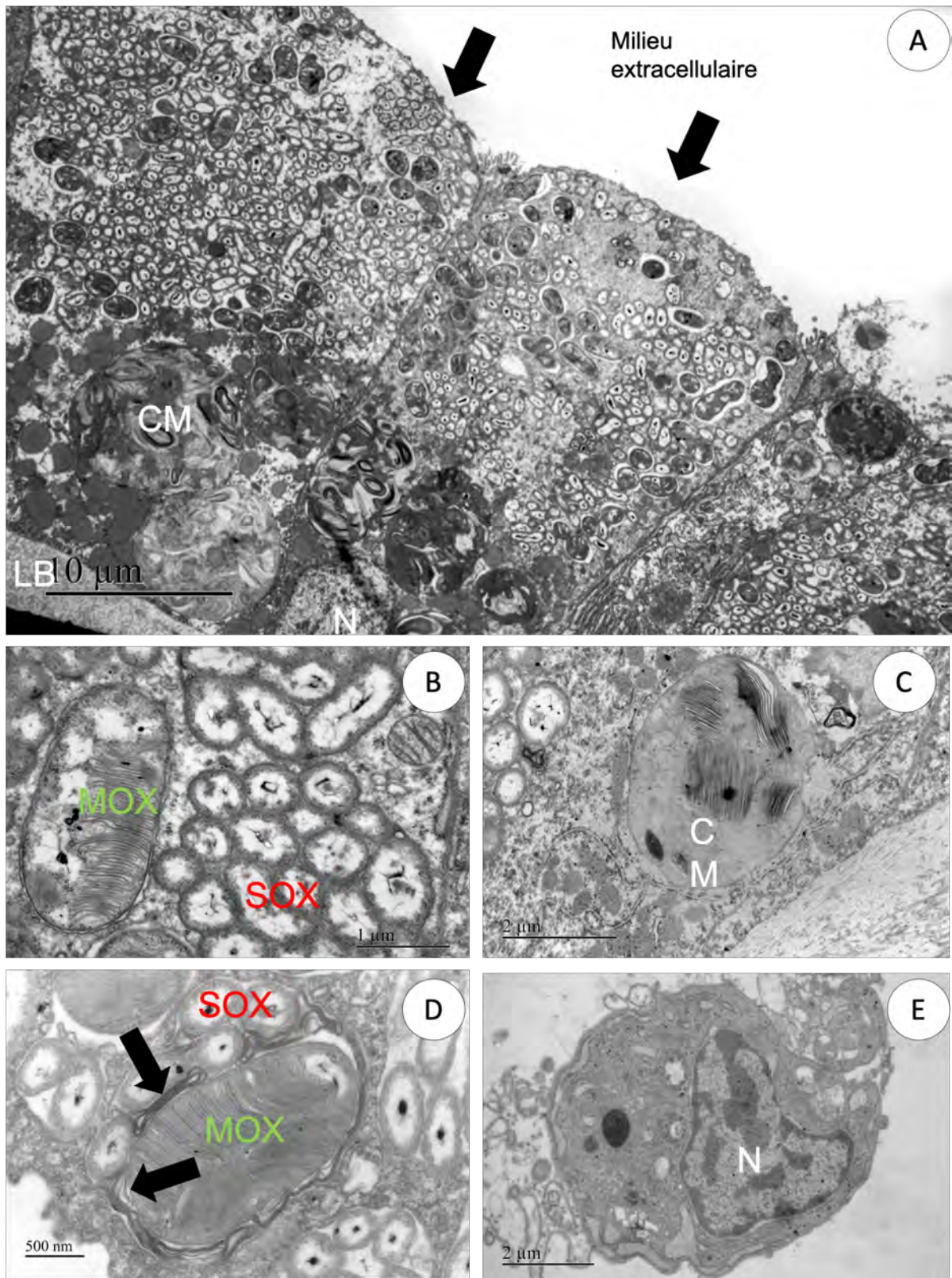


Figure 55 : Photo de la zone des bactériocytes de *Bathymodiolus azoricus* témoin de la remontée prise au microscope électronique à transmission. A) Moule de Menez Gwen venant de remonter de son site. Les flèches montrent les microvillosités développées du bactériocyte. B) Détails d'un bactériocyte dans une moule de Menez Gwen. Les deux types de symbiotes sont isolés dans des vacuoles différentes. C)

détails d'un corps multilamellaire près de la lame basale. D) Détails d'un bactériocyte d'une moule de Lucky Strike. Les deux types de symbiotes sont localisés dans la même vacuole. Les flèches montrent des bactéries sulfo-oxydantes dégradées. E) Photo d'un corps apoptotique. N : noyau ; CM : corps multilamellaires ; LB : lame basale ; SOX bactérie sulfo-oxydante ; MOX bactérie méthanotrophe.

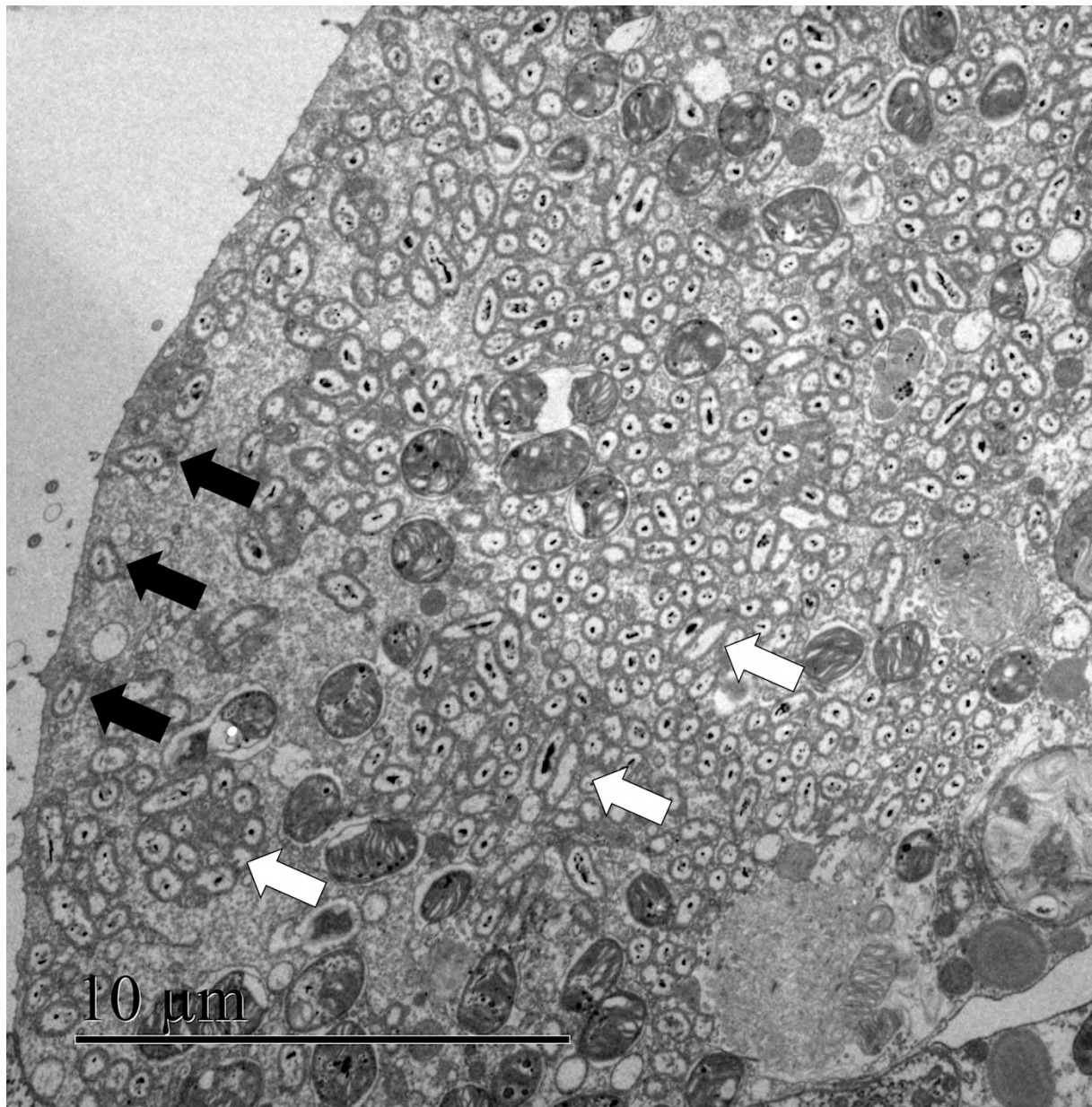


Figure 56 : Photo au microscope électronique à transmission d'un détail d'un bactériocyte d'un témoin de *B. azoricus* du site Menez Gwen. Les flèches noires près du milieu externe montrent des bactéries sulfo-oxydantes seules dans une vacuole. Les flèches blanches montrent des bactéries sulfo-oxydantes en grand nombre dans une vacuole.

Près de la lame basale, on observe de nombreux corps multilamellaires (figure 55 A et C). Ces corps sont des symbiotes digérés. Nous avons observé des figures de SOX entourées de membranes successives formant une structure « en pelure d'oignons » et interprétée comme des SOX en cours de digestion (figure 57). Cependant les figures de digestion de méthanotrophes sont moins évidentes à identifier avec certitude. Chez les individus témoins de Lucky Strike, dans les vacuoles possédant les deux types de symbiotes, les bactéries sulfo-oxydantes entourant une méthanotrophe semblent être digérées sans que cela n'affecte cette dernière, suggérant une digestion différentielle. (figure 55 D).

Dans les branchies des individus témoins, on peut observer des « zones blanches » (figure 58). Ces zones correspondent à une partie d'un filament où la lame basale est à nu. Les cellules semblent s'être décollées de la lame basale alors que les cellules voisines sont en parfait état (figure 58). Le noyau restant de la cellule décapée présente une chromatine particulièrement concentrée à sa périphérie, ce qui est une des caractéristiques des noyaux en apoptose. Dans ces zones, nous avons aussi observé des corps apoptotiques entourés par une membrane avec, à l'intérieur, une partie du cytoplasme d'une cellule et un noyau dont l'ADN apparaît concentré près de la membrane nucléaire (figure 55 E).

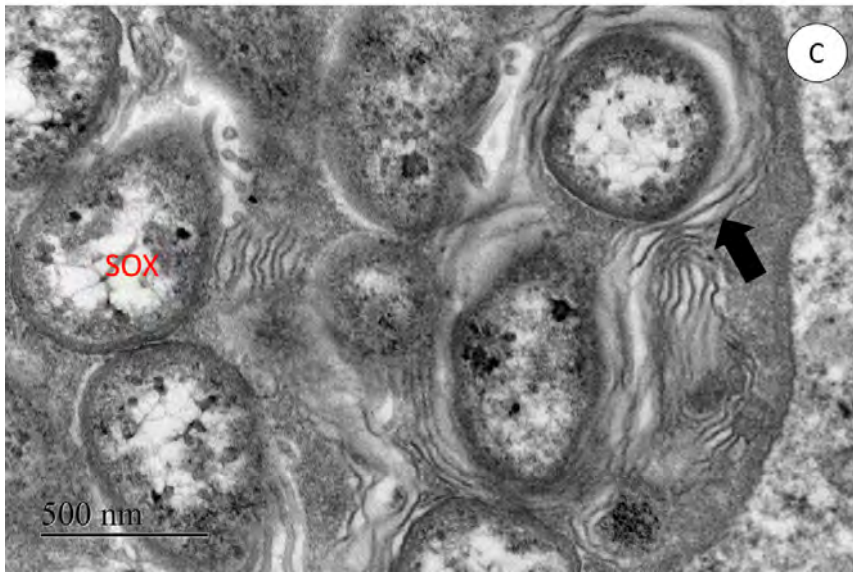
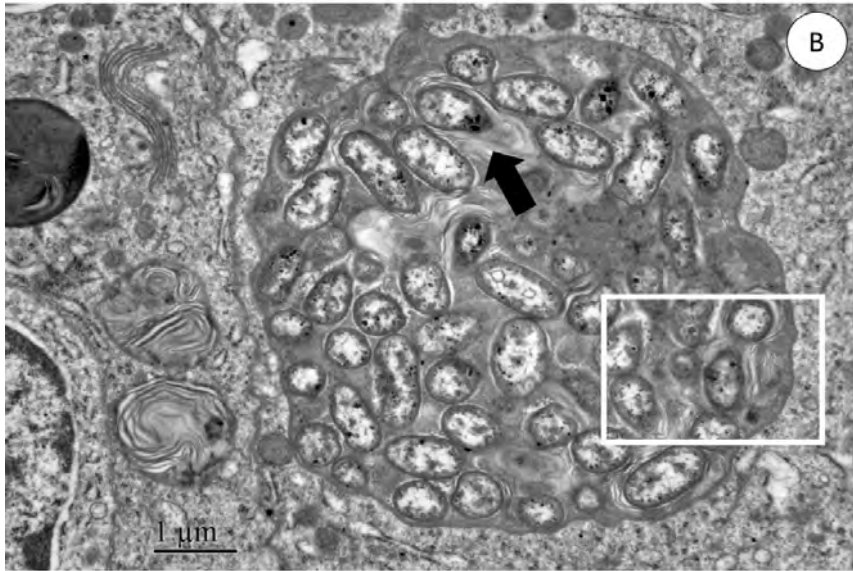
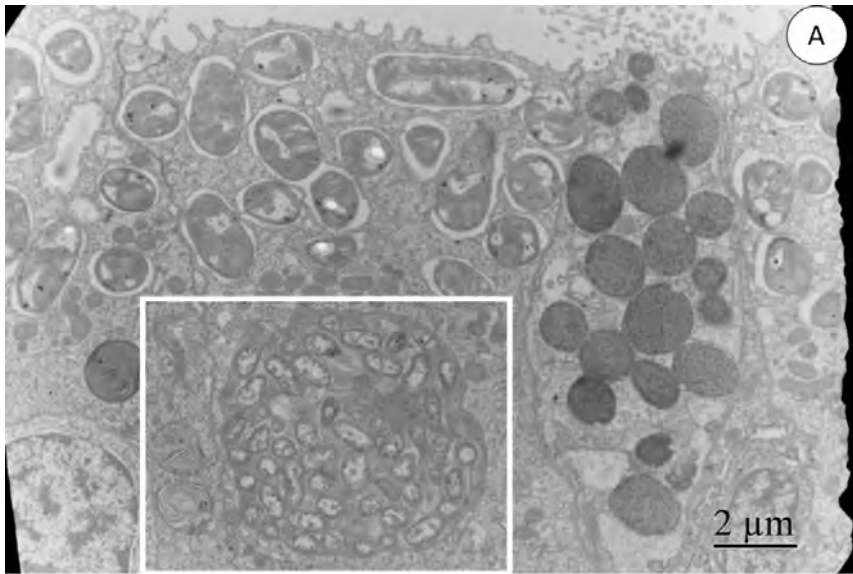


Figure 57 : Détails d'un corps multilamellaire dans un bactériocyte d'un témoin de *Bathymodiolus azoricus* du site Menez Gwen. A) Photo d'un bactériocyte avec de nombreuses bactéries méthanotrophes et d'une vacuole contenant des bactéries sulfo-oxydantes. B) Agrandissement du cadre de la photo A. C) Agrandissement du cadre de la photo B. Les flèches noires montrent les lamelles qui entourent des bactéries sulfo-oxydantes en cours de digestion.

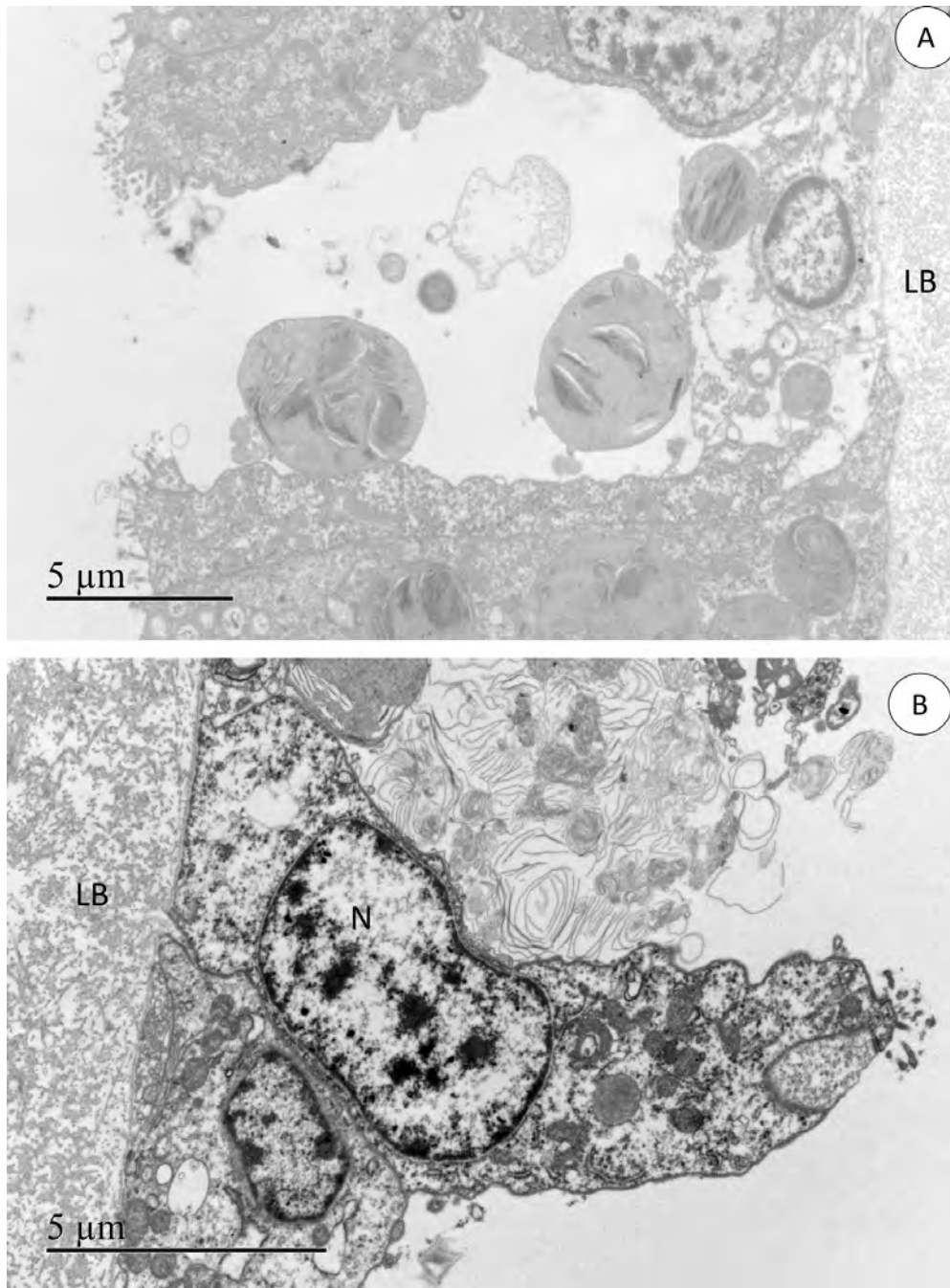


Figure 58 : Photo en microscopie électronique de *Bathymodiolus azoricus* venant d'être remontée de son site. A) Entre deux cellules intercalaires en parfait état, on observe une zone vide et quelques corps multilamellaires. B) Une cellule intercalaire et une cellule dégradée à côté.

La différence entre les bactériocytes des individus venant d'être remontés et les individus ayant jeûné entre 6 et 8 jours est importante. Dans les bactériocytes des moules qui ont jeûné, le nombre de corps multilamellaires augmente au cours du jeûne (figure 59).

En surface, les symbiotes isolés dans leur vacuole présentent déjà des aspects un peu altérés, (figure 59 B et C).

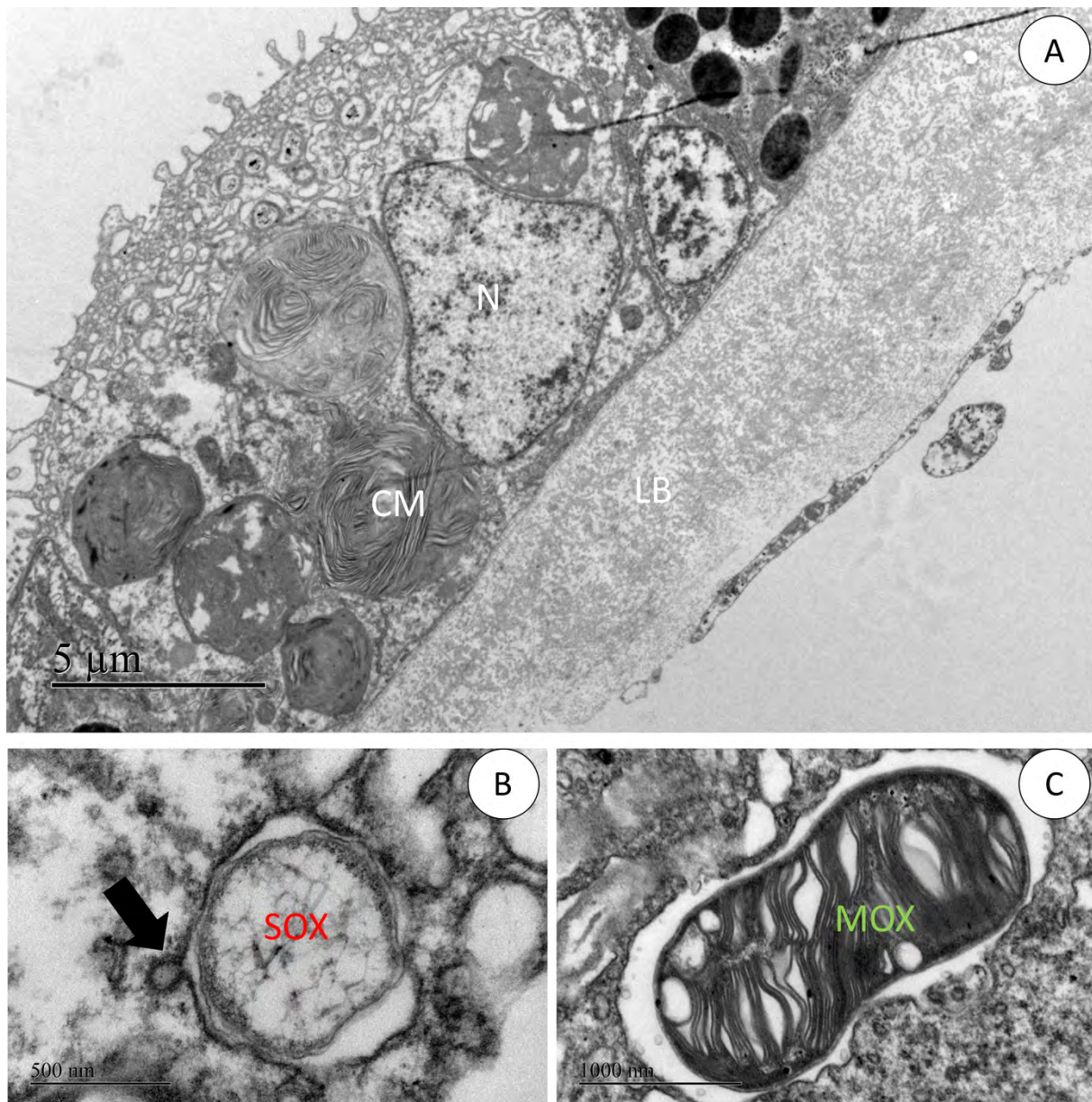


Figure 59 : Photo en microscopie électronique de *Bathymodiolus azoricus* ayant jeûné 8 jours. A) Photo d'un bactériocyte après 8 jours de jeûne. B) Bactérie sulfo-oxydante qui fusionne avec une vésicule que la flèche noire montre. C) Bactérie méthanotrophe « abîmée », les membranes sont distendues.

Chez les individus ayant jeûné 61 jours, les cellules qui étaient de grande taille sont maintenant réduites (figure 60 A, B et D). Ces nouveaux bactériocytes vides de symbiotes présentent des microvillosités plus développées (figure 60 B). Les corps multilamellaires sont moins nombreux et de plus petite taille. Des membranes semblent englober une partie du cytoplasme

de la cellule avec des organites (figure 61). Les cellules ont un cytoplasme réduit et qui ne contient que quelques organites (figure 60 D). Les filaments de branchies commencent à ressembler à ceux de *Mytilus edulis* (figure 60 C). Les cellules de *Mytilus edulis* sont cubiques avec un cytoplasme réduit autour du noyau et des microvillosités développées.

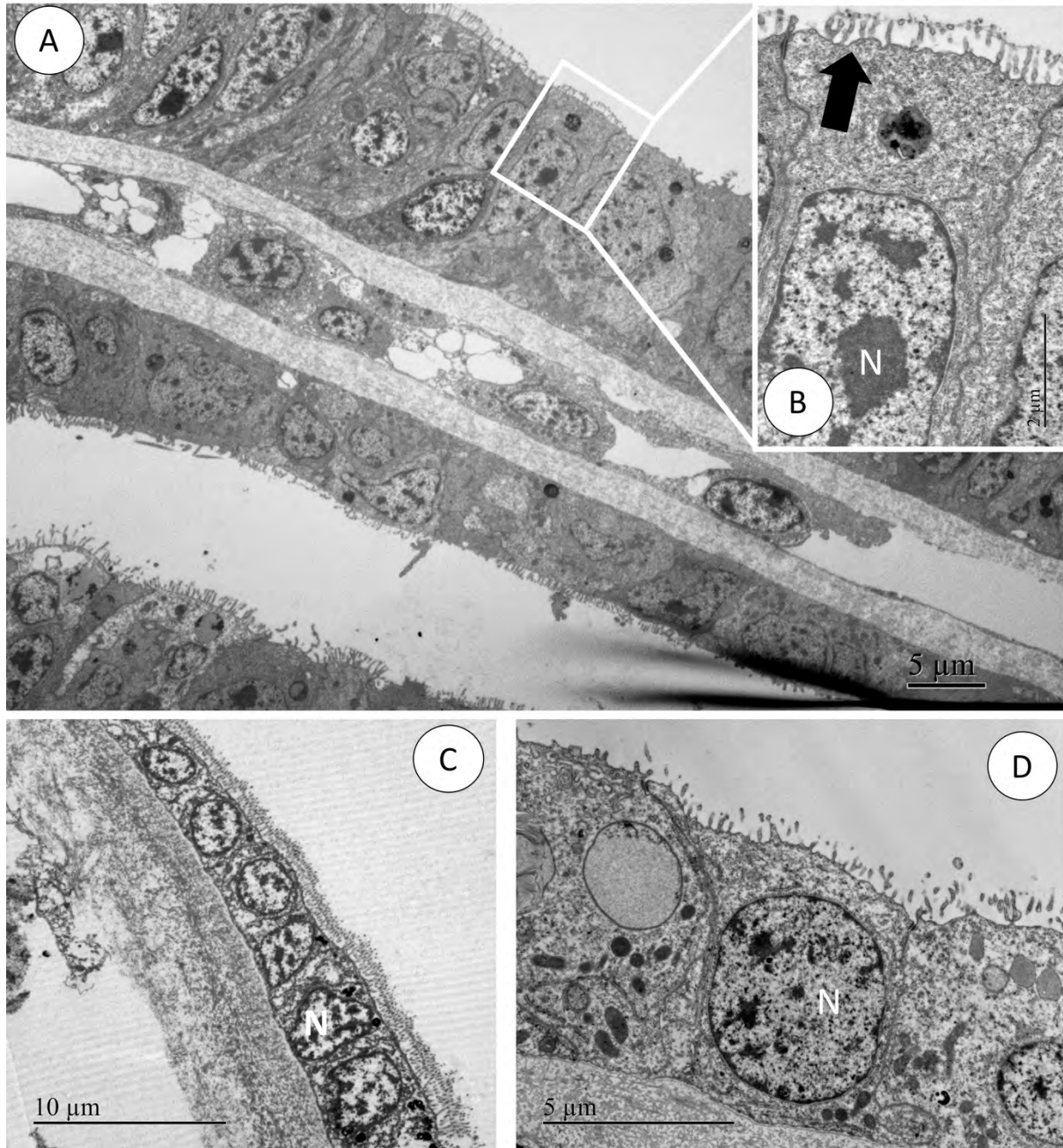


Figure 60 : Photo des filaments de branchie de *Bathymodiolus azoricus* et de *Mytilus edulis* prise au MET. A) Moule de Menez Gwen après 61 jours de jeûne. B) Détails de la photo précédente. La flèche montre les microvillosités de la cellule. C) Photo d'un filament de branchie de *Mytilus edulis*. D) Cellule de la branchie de *Bathymodiolus azoricus* après 61 jours de jeûne. La cellule se résume à un noyau et à un cytoplasme réduit. N : noyau.



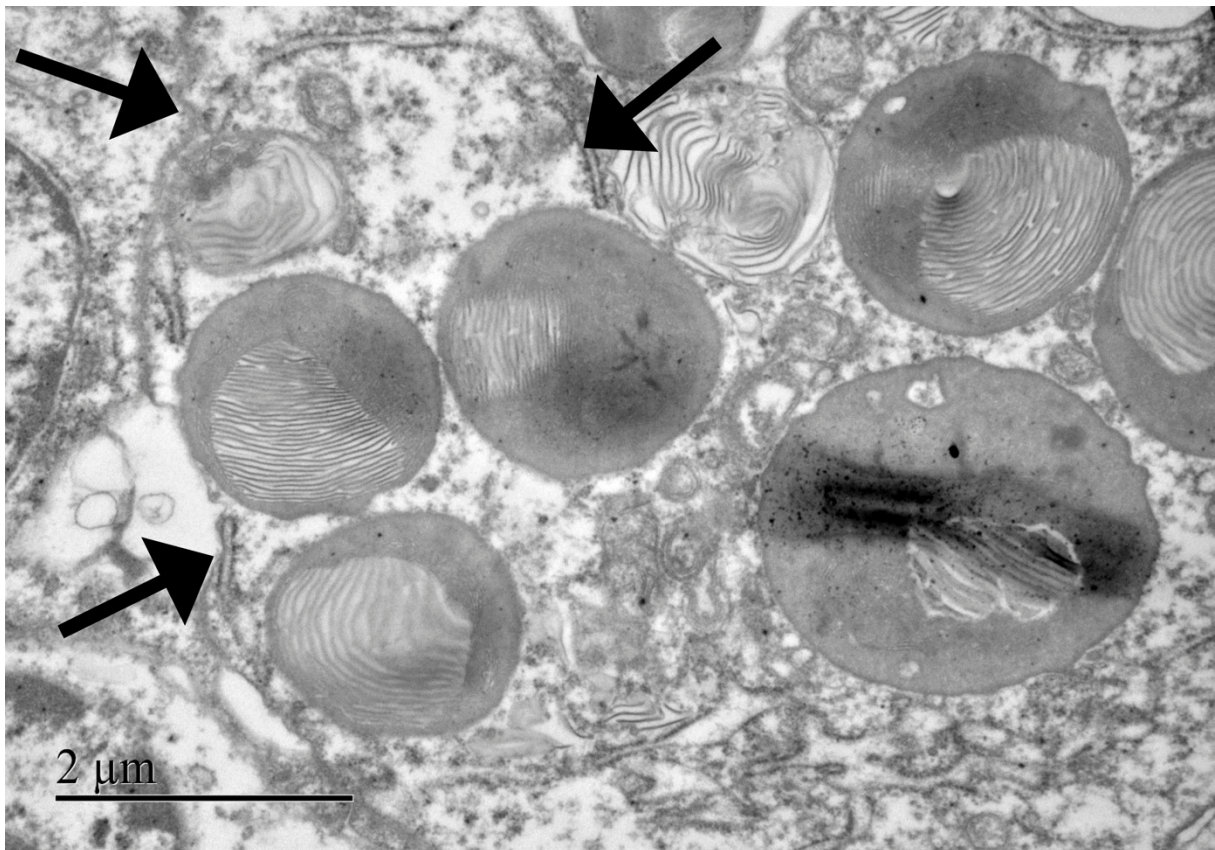


Figure 61 : Photo d'un détail d'une cellule de *Bathymodiolus azoricus* ayant jeûné 2 semaines. Les flèches montrent une double membrane qui entoure une partie du cytoplasme.

## Discussion

La perte des symbiotes chez les bathymodiales lorsqu'on les transfère dans des sites inactifs ou en aquarium en l'absence des substrats de leurs symbiotes a déjà été étudiée. Chez *Bathymodiolus thermophilus*, la perte des bactéries sulfo-oxydantes (le seul type de symbiote de *B. thermophilus* (Duperron, 2010)) est totale au bout de 12 jours (Raulfs *et al.*, 2004). Chez *B. platifrons* (qui ne possède que des symbiotes méthanotrophes (Barry *et al.*, 2002)), après 34 jours sans méthane, les moules possèdent encore une petite quantité de symbiotes. Chez *B. azoricus* du site Lucky Strike, après 6 jours hors de la moulière sur une zone inactive éloignée du fluide hydrothermal, les moules ont perdu une faible quantité de symbiotes. Après 20 et 27 jours, la perte de symbiote est importante mais les symbiotes sont encore présents (Détrée *et al.*, 2016). Chez *B. azoricus* du site Menez Gwen, après 30 jours en aquarium, on constate une perte substantielle de symbiotes (Kádár *et al.*, 2005). Dans ces différentes études, les symbiotes disparaissent dans les premières semaines après la privation en sulfure et en méthane. Selon les espèces et les conditions expérimentales (déplacement sur site inactif ou aquariums), la

dynamique de perte des symbiotes n'est pas la même. En effet, nos premières observations au MET d'un individu ayant jeûné 6 et 8 jours ne nous avait pas permis de visualiser de symbiotes sur certaines grilles de MET, tandis que le FISH indiquait la présence de signal en faible quantité. La dynamique de la perte des symbiotes présente donc une certaine variabilité individuelle, ainsi qu'une disparité au sein de l'organe branchial lui-même, certaines zones perdant les symbiotes plus vite que d'autres. Chez les témoins (branchie fixée immédiatement après leur remontée du site), les bactériocytes digèrent les symbiotes qui sont enfermés dans les vacuoles. Ces vacuoles contiennent de nombreuses bactéries près de la lame basale. Certains auteurs ont émis depuis longtemps l'hypothèse que l'hôte digèrait ces symbiotes afin de récupérer le carbone fixé (Fiala-Medioni *et al.*, 1994; Salerno *et al.*, 2005; Kádár *et al.*, 2008). Sur nos images, nous observons clairement des symbiotes en cours de digestion. Nous pouvons donc confirmer l'hypothèse du « farming » : les moules digèrent les bactéries pour s'en nourrir. L'hypothèse du « milking » (voir partie 1.2.2) ne peut être testée à partir de nos observations. Au cours de la dépuration, le nombre de bactéries augmente à l'intérieur des bactériocytes. Les vacuoles contenant les bactéries possèdent de plus en plus de symbiotes digérés et formant de grosses vésicules multilamellaires. Dans les cellules des individus ayant jeûné 2 semaines, mais aussi sur ceux qui ont jeûné 2 mois, on observe des membranes qui englobent une partie du cytoplasme. Cela pourrait peut-être correspondre à des membranes impliquées dans le processus d'autophagie. Les moules n'ayant pas de nourriture dans leur milieu et n'ayant plus de bactéries à digérer, elles pourraient recycler les composants d'une partie de leur cytoplasme pour se nourrir (Klionsky, 2007). Chez les lucines lors de la perte des symbiotes, les bactériocytes se transforment en cellules à grains et peuvent réacquérir de symbiotes (Caro *et al.*, 2009; Elisabeth *et al.*, 2012, 2014). Dans le cas des bathymodioles, les bactériocytes se transforment en cellules avec un cytoplasme réduit et des microvillosités plus importantes. Les bactériocytes après la perte des symbiotes pourraient se dé-différencier car les bactériocytes ressemblent aux cellules observées chez les post larves avant l'arrivée des symbiotes (Laming *et al.*, 2015). Il serait intéressant de replacer ces moules aposymbiotiques dans leur milieu afin de voir, si elles sont capables de réacquérir des symbiotes et donc de savoir si ces cellules pourraient se différencier à nouveau en bactériocytes. Cette remise sur site en présence de substrat pour les symbiotes et de moules possédant des symbiotes a déjà été effectué avec *Bathymodiolus azoricus*. Dans l'article de Détrée, après 6 jours hors site, les moules ont été remises sur le site pendant 20 jours. Cela a permis d'enrayer la perte des symbiotes, mais il n'y a pas eu d'augmentation de la quantité de symbiotes dans les branchies par la suite (Détrée *et*

*al.*, 2016). Sur des individus dépurés pendant 30 jours, la mise en présence de sulfure et de moules possédant leur symbiotes a permis le retour des SOX dans les branchies des moules qui avaient perdu leur symbiotes (Kádár *et al.*, 2005). Dans le cas de nos bathymodiales, la perte des symbiotes et le changement des bactériocytes est total. Ces moules seraient-elles capables de réacquérir des symbiotes ?

## 5 DISCUSSION GENERALE

---

La symbiose apporte dans certains cas un bénéfice à l'hôte, par exemple la capacité à vivre et à se nourrir dans un environnement contraignant, ou une protection contre un prédateur. Pour autant, la relation n'est pas figée dans le temps, et varie tout le long de la vie de l'holobionte, nécessitant des ajustements en permanence. Les bathymodiales sont de bons modèles pour étudier la dynamique d'une symbiose car elles vivent dans des environnements très variables qui nécessitent une régulation importante de la symbiose. Cette régulation a été étudiée au cours de la thèse à deux niveaux : (1) au niveau global de la branchie, organe dont le rôle est d'accueillir les symbiotes mais pas seulement ; et (2) au niveau de la cellule associée aux bactéries, le bactériocyte. L'importance de facteurs intrinsèques (espèce hôte, à travers la comparaison de plusieurs espèces) et extrinsèques (environnement, à travers la comparaison de plusieurs sites et de différentes conditions lors des incubations) a été considérée, afin d'identifier les grandes lignes qui caractérisent la flexibilité de l'association entre bathymodiales et bactéries chimiotrophes.

Nous avons dans un premier temps étudié la multiplication des cellules de la branchie de *Bathymodiolus azoricus* et *B. puteoserpentis* afin de localiser les zones de prolifération cellulaire. Les marquages complémentaires de la phospho-histone H3 et de l'EdU nous ont permis de localiser des zones à fort taux de multiplication. Le marquage classique (Gratzner, 1982) avec le nucléotide synthétique BrdU ne nous a pas permis d'obtenir de résultat concluant. Mais pour la première fois l'EdU, la nouvelle génération du BrdU, a été utilisé sur des bivalves. Cette première étude a permis de mettre au point un protocole permettant de suivre la multiplication des cellules lors d'expérimentations. Nos résultats montrent que la zone ciliée et la zone frontale de la zone des bactériocytes (là où les bactéries sont les plus nombreuses dans les bactériocytes) sont les deux zones où les cellules branchiales se multiplient le plus.

Nous avons étudié la multiplication des bactéries à l'intérieur des cellules de l'hôte. Si l'immunolocalisation de la protéine FtsZ, responsable de l'anneau de division bactérienne, n'a pas permis de montrer de bactéries en multiplication, l'observation au MET a mis en évidence des figures de division des deux types de bactéries, sulfo-oxydantes et méthanotrophes, confirmant la capacité des bactéries à se diviser dans les cellules de l'hôte. Nous avons également observé des figures d'endo- ou d'exocytose de bactéries sulfo-oxydantes dans les bactériocytes, attestant d'une dynamique existant probablement entre l'intérieur du bactériocyte et le milieu extérieur.

Puis nous nous sommes intéressés à la diminution de la quantité de bactéries dans les branchies. Des publications récentes insistent sur le rôle possible de l'apoptose comme régulateur de la symbiose, nous avons donc étudié l'abondance et la distribution de l'apoptose dans les branchies de 4 espèces de Mytilidae, les deux espèces hydrothermales, l'espèce de suintements froids *Bathymodiolus aff. boomerang*, et l'espèce côtière *Mytilus edulis*. Le pourcentage de cellules en apoptose dans les branchies des moules côtières est nettement moins élevé que chez les moules des sources hydrothermales. Le pourcentage d'apoptose dans les branchies de moules remontées de manière pressurisée ou non est similaire, permettant de conclure que ce n'est pas la méthode de récolte qui provoque cette quantité importante d'apoptose. Dans les branchies des moules de sources hydrothermales, deux zones de fortes concentrations en noyaux apoptotiques ont été identifiées : la zone ciliée et la zone abfrontale de la branchie. Une dernière comparaison avec *Bathymodiolus aff. boomerang* nous a permis d'identifier chez cette dernière le même patron de distribution de l'apoptose dans les filaments des branchies.

Une première étude sur le relargage des symbiotes dans l'environnement en conditions pressurisées et contrôlées, à l'aide du métabarcoding d'un gène bactérien, a mis en évidence la présence de symbiotes dans l'eau autour des moules à l'issue des incubations. La provenance de ces bactéries n'est pas encore élucidée mais d'autres résultats ont permis de confirmer le relargage de bactéries méthanotrophes capables de se multiplier une fois sorties de la branchie. La dernière partie de la thèse a été consacrée au suivi de la dynamique du tissu branchial lors de la perte de ses symbiotes et son passage de la mixotrophie à l'hétérotrophie. L'observation des bactériocytes des moules remontées de leur milieu montre l'endocytose (ou l'exocytose) de symbiotes dans la zone apicale, leur multiplication dans la zone médiane et la digestion des symbiotes dans la zone basale de la cellule. Lors de la dépuration, les symbiotes sont digérés puis une partie du cytoplasme des bactériocytes semble lui aussi être digéré. Après un jeûne prolongé, les cellules de la zone des bactériocytes ressemblent aux cellules des branchies de la moule côtière *Mytilus edulis*, avec des cellules possédant peu de cytoplasme et de nombreuses microvillosités. Un retour de la branchie à un état similaire à une moule dépourvue de symbiotes est intéressant, il semble y avoir peu de modifications nécessaires pour passer d'une branchie non symbiotique à une branchie capable d'accueillir des bactéries. Au cours de l'évolution, la symbiose chimiotrophe est apparue au moins 5 fois indépendamment chez les bivalves (Duperron *et al.*, 2013). Elle a disparu chez au moins une espèce de petite moule de la sous famille des Bathymodiolinae (dont font partie nos espèces) *Idas argenteus* (Ockelmann and Dinesen, 2011; Rodrigues *et al.*, 2015). Chez les Thyasiridae, certaines espèces possèdent des

symbiotes et d'autres non (Dufour, 2005; Batstone and Dufour, 2016). Cette association entre bivalve et bactéries semble donc particulièrement flexible, non seulement pendant la vie de l'hôte, mais aussi au cours de l'évolution.

A travers ces travaux, plusieurs mécanismes cellulaires ont été étudiés afin de confirmer leur rôle possible dans la régulation de la symbiose. Leur examen souligne l'importance de la dynamique de l'organe lui-même contenant les symbiotes, la branchie. Nous allons synthétiser ci-dessous nos résultats pour donner une vision intégrée de la dynamique branchiale de régulation des symbiotes.

### **5.1 APOPTOSE ET MULTIPLICATION, UNE ZONE FRONTALE CILIEE TRES DYNAMIQUE**

D'après nos résultats des chapitres 3 et 4, le tissu branchial des bathymodioles apparaît beaucoup plus dynamique que celui de la moule côtière non symbiotique. Une proportion très importante des cellules de la branchie est en multiplication et en apoptose chez les moules des sources hydrothermales comparée à celle des moules côtières, chez qui elle est sporadique et sans patron de localisation clair. Il est intéressant de constater que la zone ciliée montre à la fois un fort taux de multiplication et un fort taux d'apoptose (figure 62).

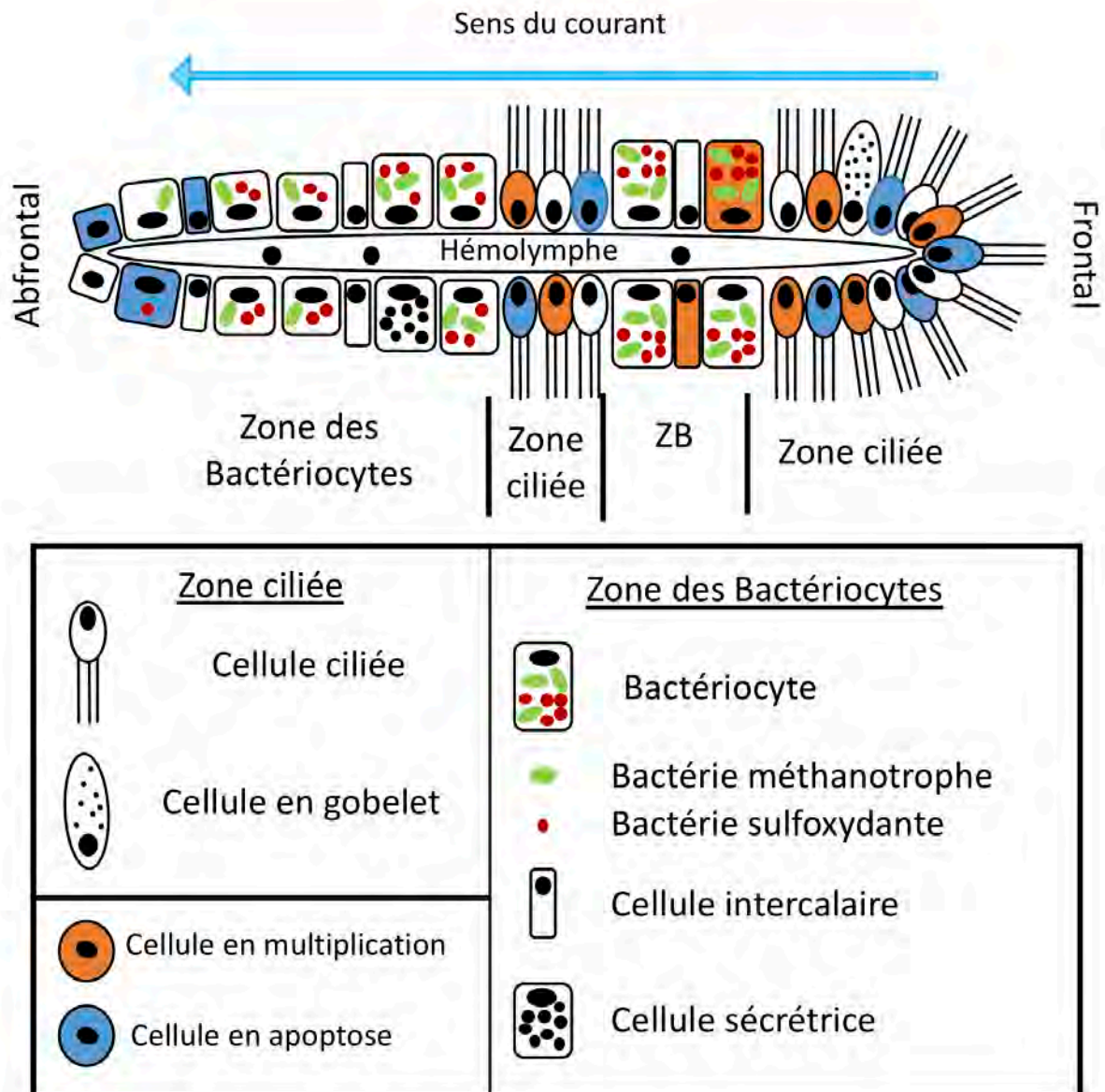


Figure 62 : Schéma représentant une coupe transversale d'un filament de branchie de *Bathymodiolus azoricus* montrant les zones de multiplication et de mort cellulaire. En orange sont représentées les cellules qui se multiplient et en bleu les cellules qui sont en apoptose.

Cette zone a donc apparemment un turn-over important des cellules. Située en périphérie de la branchie, la zone ciliée est la première en contact avec le flux palléal inhalant provenant du milieu extérieur toxique des sources hydrothermales. Ce turn-over très important pourrait donc être dû à la présence de composés toxiques comme le sulfure d'hydrogène (toxique pour la respiration cellulaire) ou les métaux lourds dans le fluide hydrothermal. Les cellules ciliées ne possédant pas de symbiote, (manquant notamment des bactéries sulfo-oxydantes, qui permettent de convertir les sulfures en composés non toxiques comme les sulfates), pourraient rentrer en apoptose en réaction au stress chimique et devoir être rapidement remplacées. Une

autre explication serait que les cellules ciliées, qui sont à l'origine des mouvements d'eau dans la branchie hypertrophiée, seraient très actives ce qui provoquerait une usure, et donc une mort plus rapide de ces cellules. En effet, la quantité de symbiotes est importante dans les branchies et donc un apport important en substrat est nécessaire afin de nourrir et d'acquérir ces bactéries (Szafranski *et al.*, 2015), et d'autre part le grand volume des branchies nécessite davantage d'énergie pour mettre en mouvement l'eau. La cause exacte de ce turn-over cellulaire important est difficile à établir car on ne peut enlever les éléments toxiques pour les cellules tels que le sulfure sans perdre les symbiotes, ce qui limite nos possibilités de tester l'une ou l'autre des hypothèses. Cependant, ce résultat est totalement en accord avec la localisation de l'apoptose et de la multiplication cellulaire constatées dans les cellules frontales ciliées des lucines symbiotiques *Codakia orbiculata*, fraîchement collectées des sédiments réduits et riches en sulfures de leurs herbiers (Elisabeth *et al.*, 2012). L'apoptose est d'ailleurs un phénomène présent aussi dans les bactériocytes, tout au long de la perte de leurs symbiotes (SOX), lorsque les lucines sont maintenues en aquarium sans source de sulfures. Ainsi, l'apoptose couplée à la multiplication cellulaire constituent les deux mécanismes permettant d'assurer la plasticité de la branchie et sa reconversion en branchie aposymbiotique (Elisabeth *et al.*, 2012). Le trait commun entre ces bivalves symbiotiques est qu'apoptose et multiplication sont constatés dès qu'on retire l'hôte de son milieu (*i.e.* le sédiment ou les sources hydrothermales et les fluides froids), tous riches en composés réduits (sulfures et méthane). Or ce sont précisément ces substrats qui sont nécessaires à la vie et à la production de leurs symbiotes. Notre dernière hypothèse est donc qu'apoptose et multiplication seraient les réponses immédiates des cellules branchiales de l'hôte à la perte progressive de leurs symbiotes, dès que ces derniers sont privés de nourriture. Ceci justifierait davantage la différence de dynamisme cellulaire entre une moule côtière (qui pourrait elle aussi être au contact de polluants xénobiotiques dans l'eau) et un bivalve symbiotique, car ce dernier devrait gérer la mort, ou « l'inutilité » (*i.e.* l'absence de production de molécules carbonées) de ses symbiotes, voir même ses symbiotes pourraient devenir des parasites. En effet, Zhao et Hanson ont montré que certains méthanotrophes en absence de méthane étaient capables de croître en utilisant du glucose (Zhao and Hanson, 1984). Ainsi, les symbiotes méthanotrophes privés de leur source de méthane pourraient pomper le glucose de leur hôte et cela expliquerait l'élimination rapide des symbiotes devenus des parasites. Une façon de le tester serait d'analyser les taux d'apoptose et de multiplication cellulaire chez des bivalves symbiotiques maintenus en aquarium avec suffisamment de sulfures/méthane pour conserver tous leurs symbiotes, bien que ce milieu artificiel ne garantisse pas de mimer la



situation que l'hôte et ses symbiotes rencontrent au sein de leur habitat naturel. En effet, des expériences précédentes, on réussi à maintenir 6 mois des symbiotes SOX lorsque des sulfures étaient rajoutés à *B. azoricus* dans l'aquarium (Colaco *et al.*, 2011). Par contre les MOX disparaissaient même en présence de méthane (Colaco *et al.*, 2011). Mais lors de ces maintenances, ni l'apoptose, ni la multiplication des cellules branchiales n'ont été suivis et le protocole de maintenance des bathymodiales nécessiterait peut être encore des recherches afin d'être optimisé.

## 5.2 LA DYNAMIQUE CELLULAIRE DES BACTERIOCYTES

Les bactériocytes montrent une dynamique différente des cellules ciliées. Leur multiplication semble localisée au plus près de la zone ciliée, tandis que l'apoptose concerne surtout les cellules de la zone abfrontale. Notre étude de la dynamique des cellules branchiales est partie d'une hypothèse proposée à partir de premiers résultats de transcriptomique (Guezi *et al.*, 2013). Cette hypothèse dit que l'hôte pourrait récupérer le carbone de ses symbiotes en provoquant l'apoptose des bactériocytes les plus remplis de symbiotes. Le bactériocyte serait alors une « ferme d'élevage », où les symbiotes une fois assez nombreux seraient tous tués afin d'en récupérer le carbone (Zheng *et al.*, 2017). Un élément permet d'émettre dès le départ un doute sur la validité de cette théorie. Le tissu branchial est en effet un épithélium unistratifié, ce qui signifie que sur la lame basale, il n'y qu'une seule couche de cellules. Or l'une des étapes de l'apoptose est le détachement de la cellule des cellules voisines (Häcker, 2000). Dans le cas des moules, cela signifie se détacher de la lame basale et des cellules voisines. Nous avons d'ailleurs observé en microscopie électronique des « zones blanches » où les cellules sont absentes et où ne subsiste que la lame basale. Il est dès lors difficile d'imaginer que les cellules voisines puissent phagocyter les corps apoptotiques qui se forment plus tard au cours du processus. En effet, les bactériocytes sont dans la branchie, où un courant d'eau crée par les cellules ciliées emporterait les corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques pourraient aller dans le cordon alimentaire, mais jamais aucun symbiote des branchies n'a été détecté de manière convaincante dans le tractus digestif (Com. Pers. S. Duperron). De plus, nos premiers essais pour tester la capacité des bathymodiales à filtrer les microalgues de grande taille suggèrent que les particules de cette taille ne sont que très peu retenues par le système de filtration. Compte tenu de ces contraintes, la voie de l'apoptose ne paraît pas être le meilleur moyen de récupérer le carbone des symbiotes comme c'est le cas de *Riftia* et du charançon où les symbiotes ne sont pas accueillis dans un épithélium (Pflugfelder *et al.*, 2009; Vigneron *et al.*,

2014). Le modèle connu le plus proche des bathymodioles est *Codakia orbiculata*. L'étude de l'apoptose dans ses branchies ne suggère pas que ce mécanisme soit utilisé pour la récupération de carbone des symbiotes (Elisabeth *et al.*, 2012).

L'étude des patrons d'apoptose dans les bactériocytes des bathymodioles a révélé que c'est la zone abfrontale qui montre le plus d'apoptose, *i.e.* la zone où les bactériocytes sont les moins chargés en symbiotes. La zone où les bactériocytes se multiplient le plus est la zone frontale, où ils sont très riches en bactéries. Proche de la zone ciliée, la zone frontale est la première par laquelle transite le fluide contenant les substrats des symbiotes, favorisant sans doute la croissance des bactéries. L'abondance d'apoptose dans la zone abfrontale pourrait être liée à l'absence de symbiotes, soit que ceux-ci ne protègent plus la cellule contre les éléments toxiques, soit que la cellule n'ait plus la capacité de se nourrir de ses symbiotes. Les premiers résultats en transcriptomique obtenus durant la thèse (voir annexe partie 7.2.1) montrent un grand nombre de gènes différents codant pour des Bcl-2 (4 pour l'instant étudiés mais il en existerait d'autres). Ces Bcl-2 jouent un double rôle : ils régulent à la fois l'apoptose et l'autophagie (Levine *et al.*, 2008). Il y a une mutuelle inhibition entre l'apoptose et l'autophagie (Maiuri *et al.*, 2007). Les premiers résultats sur l'expression de ces gènes montrent qu'ils ne s'expriment pas tous dans le même sens, certains sont sous-exprimés et d'autre sur-exprimés. Il semble y avoir une régulation importante entre ces deux mécanismes. Donc le mécanisme de l'autophagie que Dows décrit comme de la symbiophagie pousserait l'hôte à digérer ces symbiotes dans les bactériocytes (Downs *et al.*, 2009) et une fois la quantité de symbiote trop faible, l'autophagie n'étant plus possible (les symbiotes étant tous digérés), la cellule entrerait en apoptose. Au vu du taux d'apoptose plus élevé dans les cellules branchiales pauvres en bactéries (zone ciliée et zone abfrontale) comparé aux bactériocytes riches en symbiotes, on pourrait également proposer l'hypothèse que les bactéries produisent des composés anti-apoptotiques capables de retarder l'apoptose des cellules dans lesquelles elles sont abondantes. La branchie des bathymodioles est un organe modifié qui accueille les symbiotes tout en conservant son premier rôle de filtration. Si, dans un premier temps, le fort taux d'apoptose a été proposé comme un moyen direct de récupérer le carbone des symbiotes (Zheng *et al.*, 2017), nos travaux invalident cette hypothèse puisqu'au sein de la branchie, ce sont justement les cellules les moins riches en symbiotes qui entrent en apoptose. C'est bien la dynamique cellulaire de la branchie dans son ensemble qui diffère clairement de sa proche parente *Mytilus edulis*. Elle semble nettement plus intense, avec des taux de multiplication et d'apoptose plus élevés, mais qui ne concernent pas en priorité les cellules contenant beaucoup de symbiotes.

Ceci semble plutôt être une adaptation à l'environnement des moules et à la présence des symbiotes, qui s'accompagnent d'une hypertrophie de la branchie probablement liée au gigantisme des bathymodiales, dont les besoins énergétiques imposent d'abriter un très grand nombre de symbiotes et donc de leur faire de la place (Duperron *et al.*, 2016).

Cette thèse permet donc de dessiner un premier patron de la multiplication et de la mort des cellules dans les branchies des bathymodiales. Nous avons par ailleurs mis en évidence une zone de multiplication cellulaire importante au niveau de la partie dorsale des filaments branchiaux, là où ils s'attachent au reste du corps. Cette zone correspond en fait à la zone de croissance initiale de l'organe branchial chez les Mytilidae (Cannuel *et al.*, 2009). Chez les bathymodiales, la croissance de la branchie dans son ensemble quand le nombre de filaments branchiaux augmente parce que des nouveaux filaments se forment dans la partie postérieure, mais la taille des filaments elle-même (*i.e.* la longueur du « W ») augmente dans le sens dorso-ventral parce qu'il y a une zone de croissance dans la partie dorsale. Cette zone chez *Bathymodiolus* est peut-être d'autant plus active, que la branchie des bathymodiales est hypertrophiée, ce qui est aussi en lien avec la grande quantité de symbiotes présents (Duperron *et al.*, 2009). Il serait intéressant d'étudier la dynamique des cellules branchiales chez les moules symbiotiques de plus petite taille, comme celles des genres *Idas* ou *Adipicola*, qui ont des branchies nettement moins hypertrophiées au regard de la taille des hôtes, afin de voir si les taux d'apoptose et de prolifération sont plus faibles que chez les grandes bathymodiales (Duperron *et al.*, 2009).

### **5.3 LE RELARGAGE ET L'ENDOCYTOSE, DEUX MECANISMES QUI PERMETTRAIENT UNE TRANSMISSION LATERALE DES SYMBIOTES**

Les bactériocytes accueillent les bactéries symbiotiques. Ces bactéries sont acquises lors du stade juvénile, peu après l'installation sur le fond, et maintenues ensuite dans les branchies (Wentrup *et al.*, 2013; Laming *et al.*, 2015). Les filaments branchiaux néoformés dans la zone postérieure de la moule semblent pouvoir acquérir des bactéries tout au long de la vie de l'animal. Wentrup et collaborateurs proposent que les filaments plus anciens pourraient transmettre des symbiotes à ces nouveaux filaments (Wentrup *et al.*, 2014). Comme nous avons pu le voir en microscopie électronique et comme d'autres ont pu le voir, on observe de nombreuses figures possibles d'endocytose ou d'exocytose de bactéries (Won *et al.*, 2003;

Salerno *et al.*, 2005). Donc l'augmentation de la quantité de symbiotes pourrait se faire au moins en partie par l'endocytose de bactéries provenant de l'environnement. L'endocytose est d'ailleurs reconnue comme le mode majeur d'acquisition des symbiotes chez les lucines du genre *Codakia* (Elisabeth *et al.*, 2012; Gros *et al.*, 2012). On connaît des formes libres de symbiotes de lucines dans l'environnement de ces lucines, en revanche la provenance des bactéries a été très peu étudiée chez les bathymodiales, et on ignore si elles proviennent d'autres moules ou si des populations de formes libres de bactéries existent dans l'environnement (Laming *et al.*, 2018). Nos résultats montrent le relargage d'une petite quantité de symbiotes dans l'environnement à partir d'individus adultes vivants de moules placés dans l'eau stérile, ainsi qu'à partir de tissu branchial extrait de ces individus, mimant la mort. Ce relargage rend disponibles les bactéries pour la colonisation d'autres individus. Identifier par exemple des bactéries méthanotrophes actives sur des lames dans cette dernière expérience indique qu'à la mort de la cellule branchiale, les symbiotes pourraient s'échapper et former des tapis bactériens. Nos premiers résultats, qui restent à confirmer, montrent un relargage de symbiotes méthanotrophes qui semblent capables de se multiplier dans l'environnement à l'instar des symbiotes de *Riftia* (Klose *et al.*, 2015). Ces bactéries pourraient ainsi former un stock de bactéries que les bathymodiales voisines pourraient endocyter.

Les moulières forment des agrégats de moules extrêmement denses, atteignant 400 à 700 individus par m<sup>2</sup> (Colaço *et al.*, 1998) et donc le relargage dans l'environnement proche pourraient permettre la transmission des symbiotes à des individus voisins, à tous les stades de leur développement. Cette transmission des symbiotes serait donc une transmission latérale (*i.e.* entre individus proches avec un temps de résidence dans l'environnement court), bien qu'elle n'exclue pas la transmission environnementale (avec des bactéries libres capables de boucler leur cycle de vie hors de l'hôte). Le génome des bactéries sulfo-oxydantes est d'ailleurs réduit, il est donc peu probable que ces symbiotes puissent boucler leur cycle de vie en dehors de l'hôte (Ponnudurai *et al.*, 2016). Pour les méthanotrophes, on ignore encore ce qu'il en est, mais l'identification de formes actives dans nos expériences suggère qu'il pourrait exister des formes libres autonomes. L'exocytose et l'endocytose de symbiotes par les bactériocytes pourraient permettre le relargage et l'infection des nouvelles cellules voisines, et de nouveaux individus. La microscopie électronique à transmission confirme l'abondance de figures d'exo/endocytose, sans nous permettre de savoir à ce stade le sens dans lequel vont les symbiotes.

#### 5.4 UNE POLARITE APICO-BASALE DANS LE BACTERIOCYTE, ENTRE ACQUISITION, MULTIPLICATION ET DIGESTION DES SYMBIOTES

Près du milieu extracellulaire, au niveau de la zone apicale des bactériocytes, au plus près de l'eau qui circule dans la branchie, les vacuoles contiennent souvent une seule bactérie tandis que près de la lame basale les vacuoles contiennent plus d'une douzaine de symbiotes (figure 63).

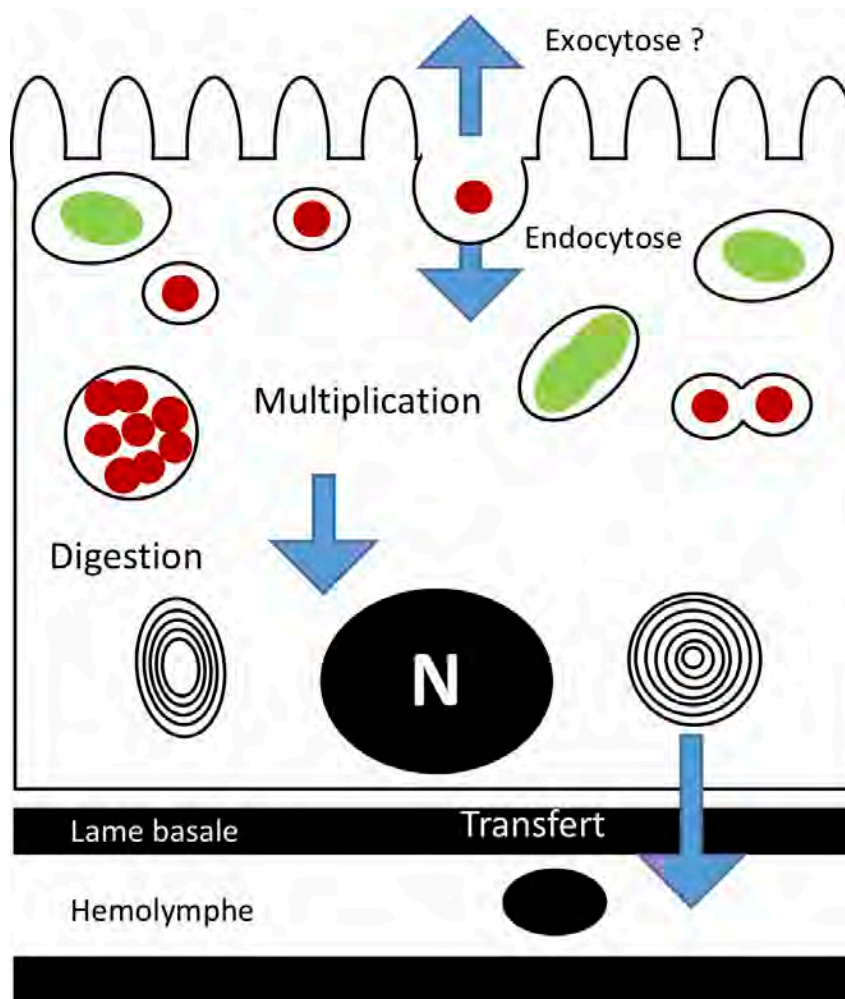


Figure 63 : Schéma représentant un bactériocyte de *Bathymodiolus azoricus* et l'hypothèse du devenir des symbiotes. Les symbiotes seraient endocytés depuis le milieu extérieur puis les bactéries pourraient se multiplier dans une vacuole qui serait ensuite digérée, transférant alors le carbone à l'hôte.

L'observation au MET a permis de voir des figures de multiplication des symbiotes. Les vacuoles contenant une grande quantité de bactéries contiennent principalement des SOX. Les MOX ne sont quant à elles qu'une ou deux par vacuole. La plupart des images de multiplication bactérienne concernent les SOX. Il semble donc qu'il y ait une différence entre les deux types

de bactéries : des SOX en prolifération dans les vacuoles, de plus en plus grandes basalement tandis que les densités de MOX semblent croître moins vite. L'expérimentation en aquarium pressurisé d'exposition de bathymodiales à du sulfure d'hydrogène a d'ailleurs démontré une augmentation rapide et significative des densités de SOX, tandis que l'exposition avec du méthane ne semblait pas avoir le même effet sur les MOX (Szafranski *et al.*, 2015; Duperron *et al.*, 2016). Bien que localisées dans la même cellule hôte, ces deux types de symbiotes n'ont peut-être pas le même rythme et il faut les étudier séparément. Des différences entre hôtes peuvent aussi exister, ainsi les *Bathymodiolus azoricus* du site Menez Gwen abritent les deux types de symbiotes dans des vacuoles différentes, alors que les *B. azoricus* de Lucky Strike possèdent les deux types de symbiotes dans une même vacuole. A Lucky Strike, nous avons pu observer la digestion des SOX tandis que la MOX voisine, pourtant située dans la même vacuole, n'était pas en cours de digestion. Il pourrait ainsi exister aussi une forme de compétition à l'intérieur même d'une vacuole entre les symbiotes, ou bien une capacité des hôtes à réaliser la digestion différentielle des deux types de symbiotes. De telles hypothèses pourraient être testées en comparant des moules qui ne possèdent qu'un seul type de bactérie face à des moules nouant des symbioses avec plusieurs bactéries.

En arrivant près de la lame basale, de nombreux corps multilamellaires sont visibles. Nos observations au MET montrent la digestion des bactéries, en particulier des SOX. Lors de nos observations, nous n'avons pas vu de forme évidente de digestion de MOX. Un haut niveau d'expression des enzymes digestives dans les branchies des bathymodiales montre que les cellules ont la capacité de digérer les symbiotes (Ponnudurai *et al.*, 2016). L'hypothèse du « farming » est ici confirmée dans le cas des SOX sans que l'hypothèse du « milking » ne soit pour autant rejetée, puisque le transfert des petites molécules entre bactéries et hôte n'a pu être suivi. L'hypothèse du « farming » a déjà été proposée mais nos résultats apporte une nouvelle preuve de sa validité (Fiala-Medioni *et al.*, 1994, 2002; Kádár *et al.*, 2008; Détrée *et al.*, 2016).

## **5.5 JEUNE, PERTE DES SYMBIOTES ET RESILIENCE DE LA BRANCHIE DES BATHYMODIOLES**

Lors de la dépuration, on observe l'augmentation de la quantité des corps multilamellaires. Au bout de 2 semaines, les derniers symbiotes sont souvent seuls dans leur vacuole qui présentent des figures de lyse. Au bout de 61 jours, plus aucun symbiote n'est retrouvé dans les bactériocytes. Le cytoplasme est réduit, il a été digéré par autophagie lors du jeûne. Les bactériocytes sont réduits à une cellule cubique se limitant à un noyau et à un cytoplasme réduit.

Les microvillosités sont plus développées. Les bactériocytes avec leurs microvillosités développées semblent prêts à endocyter de nouvelles bactéries. Contrairement à *Codakia orbicularis*, on n'observe pas de métamorphose des cellules en cellules à grains (Elisabeth *et al.*, 2014). Les bactériocytes sans symbiotes ressemblant aux cellules des branchies des *Mytilus edulis* avec des microvillosités moins développées. Cette différenciation des bactériocytes est durable puisque en 11 mois de maintenance seules 3 moules sur 200 sont mortes (voir annexe partie 7.1). Il faudrait démontrer si ce phénomène est réversible par un retour des moules sur site. Des expériences précédentes ont été menées sur des animaux sortis de leur milieu mais sur des courtes périodes de temps (entre 6 jours et 30 jours). Des symbiotes étaient encore présent dans leurs branchies (Kádár *et al.*, 2005; Détrée *et al.*, 2016). Donc un test sur les moules maintenues à Roscoff permettrait de savoir si la ré-acquisition des symbiotes est liée à la multiplication d'un stock restant de symbiotes (les moules maintenus en Roscoff ne possèdent plus aucun symbiote) ou la ré-infection des cellules par des bactéries environnementales.

## 5.6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lors de cette thèse, l'étude de la dynamique des cellules de la branchie a été menée principalement sur des animaux remontés de leur milieu. Cette première étude a permis de définir un patron général de la multiplication cellulaire et de l'apoptose dans la branchie. Il serait intéressant de continuer cette étude sur des animaux à différents stades de leur vie, en particulier lors de l'acquisition des symbiotes, lors de la croissance, et lors de changements de l'environnement, *i.e.* lors de la dépuration et de changement de concentration en substrat. La sortie des bathymodiales de leur site pourrait provoquer la diminution du turnover de la zone ciliée par l'absence de composés toxiques pour les cellules ou par la diminution de la quantité de bactéries. A l'heure actuelle, il est difficile de séparer les deux phénomènes. Lors de la perte des symbiotes, les bactériocytes n'ayant plus de symbiotes pourraient rentrer en apoptose et seraient remplacés par les cellules intercalaires qui se multiplieraient afin de remplacer les bactériocytes. Ou alors le turnover des cellules de la zone des bactériocytes diminuerait. Les cellules intercalaires sont chez nos témoins les seules cellules avec des microvillosités importantes, donc les cellules de la branchie aposymbiotique pourraient être des cellules intercalaires qui attendent de se différencier une fois les symbiotes revenus.

Les expérimentations réalisées durant la campagne BICOSE 2018 en présence d'EdU et de sulfure devront être analysées car elles permettront de mieux comprendre la régulation de la

symbiose pendant un changement de concentration de substrat, avec un outil de visualisation plus efficace que le BrdU.

Si l'étude de l'expression des gènes a permis de mettre en avant l'importance de l'apoptose dans les branchies des bathymodiales, seul l'observation au microscope a permis de démontrer que le lien entre apoptose et la densité de bactéries n'était pas direct, ce qui prouve l'importance des outils de visualisation dans l'examen et l'interprétation des corrélations observées à grande échelle. Il est important de coupler l'étude du transcriptome avec l'observation *de visu* afin de mieux comprendre les mécanismes régulant la symbiose.

L'exposition des moules aposymbiotiques maintenues à Roscoff à des composés du fluide hydrothermal nous permettrait de savoir si l'absence de bactérie dans la branchie provoque l'apoptose des cellules. Nous pourrions ainsi savoir si les cellules de la zone abfrontale rentrent en apoptose à cause de l'absence de bactéries qui ne sont plus là pour détoxifier ou si ces cellules rentrent en apoptose car elles ne possèdent plus de symbiotes et sont devenues inutiles (en lien avec le compromis apoptose/autophagie). Il faudrait pouvoir distinguer clairement l'autophagie de l'apoptose afin de savoir si c'est l'arrêt ou l'absence de symbiotes à digérer (symbiophage) qui provoque l'apoptose des bactériocytes de la zone abfrontale. Pour cela, il serait intéressant de faire des tests avec un anticorps anti-Lc3 un acteur de l'autophagie dans les branchies de bathymodiales couplé à l'étude de l'expression des gènes de l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2016). Cet anticorps a été testé chez l'annélide *Riftia pachyptila* sans montrer d'autophagie dans le trophosome mais les deux organes sont différents et il serait intéressant d'étudier ce mécanisme chez les bathymodiales (Pflugfelder *et al.*, 2009). L'autophagie chez les coraux et le charançon est décrite comme un mécanisme de la régulation de la symbiose (Dunn *et al.*, 2007; Vigneron *et al.*, 2014) et nos images en microscopie électronique semblent montrer un début de formation d'autophagosome dans les bactériocytes en dépuration.

Les bactériocytes se multiplient près de la zone frontale. Au niveau des bactériocytes, l'endocytose des bactéries devrait être suivie tout le long du filament afin de déterminer s'il existe une zone où les symbiotes sont préférentiellement endocytés. Les cellules de la zone des bactériocytes se multiplient préférentiellement dans la zone frontale donc cette zone pourrait être le lieu d'endocytose des symbiotes qui se multiplieraient. Alternativement, on peut imaginer que tous les bactériocytes sont capables d'endocyter des symbiotes tout le long de leur vie. L'étude des filtres réalisés pendant la campagne MOMARSAT/BioBaz 2018 pourrait nous permettre de mieux comprendre le relargage des symbiotes dans l'environnement. Il faudrait démontrer que les bactéries relarguées sont viables grâce à des approches basées par exemple



sur l'ARN (transcriptome, RT PCR ou FISH), et si elles sont capables de se diviser de manière active dans l'environnement.

La mise en présence d'autres espèces nouant elles aussi des symbioses avec des bactéries sulfoxydantes et méthanotrophes avec des post larves pourrait permettre de savoir jusqu'à quel niveau la relation hôte / symbiotes est spécifique.

La maintenance sur long terme à Roscoff de *Bathymodiolus azoricus* sans symbiotes ouvre de nouvelles possibilités. Pendant presque un an, des moules ont été maintenues sans apport de sulfure et de méthane. Les bathymodiales mixotrophes sont devenues hétérotrophes. Ce changement de régime alimentaire s'est effectué sans mortalité massive. En un an, seules 3 moules sur 200 sont mortes. Les premiers tests, sur des maintenances à court terme, montrent la réacquisition ou la multiplication d'un stock restant de symbiotes (Kádár *et al.*, 2005; Détrée *et al.*, 2016). Mais les moules après 61 jours de jeûne et 9 mois de nourrissage avec des microalgues ont totalement perdu leurs symbiotes. Si ces moules, une fois remises en présence de bactéries et des fluides hydrothermaux réacquièrent leurs symbiotes, cela pourrait être une piste dans la mise en place de stratégies de conservation des bathymodiales lors d'épisodes d'exploitation minière.

L'exploitation minière des sources hydrothermales semble de plus en plus proche avec les progrès technologiques de ces dernières années (Hauton *et al.*, 2017). L'impact de cette exploitation sur les bathymodiales est difficile à prévoir. La remise en suspension des métaux lourds et des particules toxiques pourrait impacter les moules. Les bathymodiales n'étant pas capables de se déplacer rapidement, le passage de certaines machines pourrait détruire les moulières. La conservation de bathymodiales en aquarium avec un simple nourrissage pourrait constituer un moyen de les « mettre de côté », le temps d'opérations au fond, avant de les réintroduire dans le cadre d'une restauration d'habitat. Les moules sont les animaux de la mégafaune les plus abondants, constituent la plus forte biomasse, et sont des espèces ingénieuses qui structurent l'habitat et permettent à d'autres de s'installer. La construction de plans de réintroduction des bathymodiales serait une piste à explorer, à l'image de la restauration des récifs coralliens et des herbiers qui sont cultivés dans des structures contrôlées puis réimplantés dans un milieu dégradé, afin de restaurer un écosystème (Edwards and Clark, 1999; van Katwijk *et al.*, 2009). Ceci pourrait peut-être constituer une piste prometteuse si l'exploitation ne peut être empêchée et menace des sites actifs. Il s'agit toutefois à ce stade d'une perspective très éloignée puisqu'on ignore si cette maintenance à plus long terme et une

réintroduction avec retour à l'état symbiotique sont possibles, et elle ne peut en aucun cas se substituer à des règles limitant au maximum les impacts de telles exploitations, ni constituer un prétexte quelconque au non-respect des règles environnementales en vigueur (Van Dover, 2014).

Cette thèse dresse un premier portrait des mécanismes permettant la régulation de la symbiose lors de la vie des bathymodioles et de leurs symbiotes. Cette régulation est importante afin de maintenir un équilibre dynamique entre hôte, symbiotes et environnement. La flexibilité de l'association entre la moule et ses symbiotes est une des clés de l'adaptation des bathymodioles à leur environnement variable et hostile. Un holobionte n'est pas une entité statique, de nombreux changements ont lieu lors de sa vie et les relations entre les partenaires changent. La régulation de la relation est donc une des clés du succès d'un holobionte, et doit être prise en compte afin de mieux comprendre le fonctionnement des holobiontes.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

---

- Abraham MC, Shaham S. 2004. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biology* **14**: 184–193.
- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11**: 36–42.
- Adams DW, Errington J. 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 642–653.
- Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. 2001. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO Journal* **20**: 6627–6636.
- Alt JC. 1995. Subseafloor processes in Mid-Ocean Ridge Hydrothermal systems. *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions*: 85–114.
- Altschul S. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **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. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1919.
- Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. 1993. *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *The Journal of pathology* **170**: 1–8.
- Arndt C, Gaill F, Felbeck H. 2001. Anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. *Journal of Experimental Biology* **204**: 741–750.
- Assié A, Borowski C, van der Heijden K, Raggi L, Geier B, Leisch N, Schimak MP, Dubilier N, Petersen JM. 2016. A specific and widespread association between deep-sea *Bathymodiolus* mussels and a novel family of Epsilonproteobacteria: Epsilonproteobacterial epibionts of *Bathymodiolus*. *Environmental Microbiology Reports* **8**: 805–813.
- Barros I, Mendes S, Rosa D, Serrão Santos R, Bettencourt R. 2016. *Vibrio diabolicus* immunomodulatory effects on *Bathymodiolus azoricus* during long-term acclimatization at atmospheric pressure. *Journal of Aquaculture Research & Development* **7**.
- Barry JP, Buck KR, Kochevar RK, Nelson DC, Fujiwara Y, Goffredi SK, Hashimoto J. 2002. Methane-based symbiosis in a mussel, *Bathymodiolus platifrons*, from cold seeps in Sagami Bay, Japan. *Invertebrate Biology* **121**: 47–54.
- Bates AE, Lee RW, Tunnicliffe V, Lamare MD. 2010. Deep-sea hydrothermal vent animals seek cool fluids in a highly variable thermal environment. *Nature Communications* **1**: 1–6.
- Batstone RT, Dufour SC. 2016. Closely related thyasirid bivalves associate with multiple symbiont phylotypes. *Marine Ecology* **37**: 988–997.

- Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde JL, Figueras MJ. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs: *Vibrio spp.*, bivalve molluscs, pathogens. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 34–43.
- Bettencourt R, Pinheiro M, Egas C, Gomes P, Afonso M, Shank T, Santos R. 2010. High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *BMC Genomics* **11**: 559.
- Bi E, Lutkenhaus J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161–164.
- Boatright KM, Salvesen GS. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* **15**: 725–731.
- Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gieseke A, Amann R, Jørgensen BB, Witte U, Pfannkuche O. 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. **407**: 5.
- Boutet I, Ripp R, Lecompte O, Dossat C, Corre E, Tanguy A, Lallier FH. 2011. Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* **12**: 1–13.
- Bowman JP. 1998. *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1037–1041.
- Boya P, Kroemer G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**: 6434–6451.
- Bright M, Bulgheresi S. 2010. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 218–230.
- Bright M, Lallier FH. 2010. The biology of vestimentiferan tubeworms. *Oceanography and marine biology: an annual review* **48**: 213–266.
- Brissac T, Gros O, Merçot H. 2009. Lack of endosymbiont release by two Lucinidae (Bivalvia) of the genus *Codakia*: consequences for symbiotic relationships: Endosymbiont release in *Codakia*? *FEMS Microbiology Ecology* **67**: 261–267.
- Cambon-Bonavita M-A. 2014. BICOSE cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Cambon-Bonavita M-A. 2018. BICOSE 2 cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Candela M, Consolandi C, Severgnini M, Biagi E, Castiglioni B, Vitali B, De Bellis G, Brigidi P. 2010. High taxonomic level fingerprint of the human intestinal microbiota by Ligase Detection Reaction - Universal Array approach. *BMC Microbiology* **10**: 116.
- 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). *The Biological Bulletin* **217**: 173–188.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**: 335.

- Cappella P, Gasparri F, Pulici M, Moll J. 2008. A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining. *Cytometry Part A* **73A**: 626–636.
- Caro A, Gros O, Got P, De Wit R, Troussellier M. 2007. Characterization of the population of the sulfur-oxidizing symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by single-cell analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 2101–2109.
- Caro A, Got P, Bouvy M, Troussellier M, Gros O. 2009. Effects of long-term starvation on a host bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and its symbiont population. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3304–3313.
- Cavanaugh CM, Levering PR, Maki JS, Mitchell R, Lidstrom ME. 1987. Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* **325**: 346–348.
- Cavanaugh CM, Wirsén CO, Jannasch HW. 1992. Evidence for methylotrophic symbionts in a hydrothermal vent mussel (Bivalvia: Mytilidae) from the Mid-Atlantic Ridge. *Applied and environmental microbiology* **58**: 3799–3803.
- Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Jean-Baptiste P, Holm N. 2002. Geochemistry of high H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field. *Chemical Geology*: 15.
- Chen Y, Azad MB, Gibson SB. 2010. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **88**: 285–295.
- Childress JJ, Barnes AT, Quetin LB, Robison BH. 1978. Thermally protecting cod ends for the recovery of living deep-sea animals. *Deep Sea Research* **25**: 419–422.
- Childress JJ, Fisher CR, Brooks JM, Kennicutt MC, Bidigare RR, Anderson AC. 1986. A methanotrophic marine molluscan (Bivalvia, Mytilidae) symbiosis : Mussels fueled by gas. *Science* **233**: 1306–1308.
- Chipuk JE, Green DR. 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**: 268–275.
- Circu ML, Aw TY. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **48**: 749–762.
- Colaço A, Desbruyères D, Comtet T, Alayse A-M. 1998. Ecology of the Menez Gwen hydrothermal vent field (Mid-Atlantic Ridge/Azores Triple Junction). *Cahiers de Biologie Marine* **39**: 237–240.
- Colaco A, Bettencourt R, Costa V, Lino S, Lopes H, Martins I, Pires L, Prieto C, Serrão Santos R. 2011. LabHorta: a controlled aquarium system for monitoring physiological characteristics of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *ICES Journal of Marine Science* **68**: 349–356.
- Coles SL, Brown BE. 2003. Coral bleaching: capacity for acclimatization and adaptation. In *Advances in Marine Biology* Elsevier; 183–223.
- Combes C. 2001. *Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions*.

- Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B, Fiala-Médioni A. 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Environmental Research* **58**: 377–381.
- Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, von Herzen RP, Ballard RD, Green K, Williams D, Bainbridge A, Crane K, et al. 1979. Submarine thermal springs on the galapagos rift. *Science (New York, N.Y.)* **203**: 1073–1083.
- Cosel R von, Olu K. 1998. Gigantism in Mytilidae. A new *Bathymodiolus* from cold seep areas on the Barbados accretionary Prism. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris Série II*: 655–663.
- Cosel R von, Métivier B, Hashimoto J. 1994. Three new species of *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents in the Lau Basin and the north Fiji Basin, western Pacific, and the Snake Pit area, Mid-Atlantic Ridge. *The Veliger* **37**: 374–392.
- Cosel R von, Comtet T, Krylova EM. 1999. *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *The Veliger* **42**: 218–248.
- Crépeau V, Cambon Bonavita M-A, Lesongeur F, Randrianalivelo H, Sarradin P-M, Sarrazin J, Godfroy A. 2011. Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field: Diversity and function in Lucky Strike mats. *FEMS Microbiology Ecology* **76**: 524–540.
- Dai J. 2005. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes & Development* **19**: 472–488.
- De Bary A. 1879. *Die erscheinung der symbiose*. Verlag Karl J. Trübner: Strasbrug France.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 14691–14696.
- Desbruyeres D, Segonzac M, Bright M. 2006. *Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna*.
- Dethlefsen L, Relman DA. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 4554–4561.
- Détrée C, Chabenat A, Lallier FH, Satoh N, Shoguchi E, Tanguy A, Mary J. 2016. Multiple I-type lysozymes in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and their role in symbiotic plasticity. *PLOS ONE* **11**: 1–19.
- Distel DL, Cavanaugh CM. 1994. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *Journal of bacteriology* **176**: 1932–1938.
- Distel DL, Baco AR, Chuang E, Morrill W, Cavanaugh C, Smith CR. 2000. Do mussels take wooden steps to deep-sea vents?: Marine ecology. *Nature* **403**: 725–726.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *107*: 11971–11975.

- Douville E, Charlou JL, Oelkers EH, Biennu P, Colon CJ, Donval JP, Fouquet Y, Prieur D, Appriou P. 2002. The rainbow vent fluids (36° 14' N, MAR): the influence of ultramafic rocks and phase separation on trace metal content in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fluids. *Chemical Geology* **184**: 37–48.
- Downs CA, Kramarsky-Winter E, Martinez J, Kushmaro A, Woodley CM, Loya Y, Ostrander GK. 2009. Symbiophagy as a cellular mechanism for coral bleaching. *Autophagy* **5**: 211–216.
- Dufour SC. 2005. Gill Anatomy and the Evolution of Symbiosis in the Bivalve Family Thyasiridae. *The Biological Bulletin* **208**: 200–212.
- Dunn SR, Weis VM. 2009. Apoptosis as a post-phagocytic winnowing mechanism in a coral-dinoflagellate mutualism. *Environmental Microbiology* **11**: 268–276.
- Dunn SR, Schnitzler CE, Weis VM. 2007. Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellate symbiont release during cnidarian bleaching: every which way you lose. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 3079–3085.
- Duperron S. 2010. The diversity of deep-sea mussels and their bacterial symbioses. In *The Vent and Seep Biota*, Kiel S (ed). Springer Netherlands: Dordrecht; 137–167.
- Duperron S, Nadalig T, Caprais J-C, 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. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1694–1700.
- Duperron S, Bergin C, Zielinski F, Blazejak A, Pernthaler A, McKiness ZP, DeChaine E, Cavanaugh CM, 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. *Environmental Microbiology* **8**: 1441–1447.
- Duperron S, Halary S, Lorion J, Sibuet M, Gaill F. 2008. Unexpected co-occurrence of six bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae). *Environmental Microbiology* **10**: 433–445.
- Duperron S, Lorion J, Samadi S, Gros O, Gaill F. 2009. Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *Comptes Rendus Biologies* **332**: 298–310.
- 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: Variability of symbiont abundances in a seep mussel. *Geobiology* **9**: 481–491.
- 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, Quiles A, Szafranski KM, Léger N, Shillito B. 2016. Estimating symbiont abundances and gill surface areas in specimens of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus puteoserpentis* maintained in pressure vessels. *Frontiers in Marine Science* **3**: 1–12.
- Durand L, Roumagnac M, Cuff-Gauchard V, Jan C, Guri M, Tessier C, Haond M, Crassous P, Zbinden M, Arnaud-Haond S, et al. 2015. Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* resident gut epibiont

- communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites (G King, Ed). *FEMS Microbiology Ecology* **91**: fiv101.
- Edwards AJ, Clark S. 1999. Coral Transplantation: A Useful Management Tool or Misguided Meddling? *Marine Pollution Bulletin* **37**: 474–487.
- Elisabeth NH, Gustave SDD, Gros O. 2012. Cell proliferation and apoptosis in gill filaments of the lucinid *Codakia orbiculata* (Montagu, 1808) (Mollusca: Bivalvia) during bacterial decolonization and recolonization. *Microscopy Research and Technique* **75**: 1136–1146.
- Elisabeth NH, Caro A, Césaire T, Mansot J-L, Escalas A, Sylvestre M-N, Jean-Louis P, Gros O. 2014. Comparative modifications in bacterial gill-endosymbiotic populations of the two bivalves *Codakia orbiculata* and *Lucina pensylvanica* during bacterial loss and reacquisition. *FEMS Microbiology Ecology* **89**: 646–658.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**: 495–516.
- Fang L, Huang S, Lin K. 1997. High temperature induces the synthesis of heat-shock proteins and the elevation of intracellular calcium in the coral *Acropora grandis*. *Coral Reefs* **16**: 127–131.
- Faure B, Jollivet D, Tanguy A, Bonhomme F, Bierne N. 2009. Speciation in the deep sea: Multi-locus analysis of divergence and gene flow between two hybridizing species of hydrothermal vent mussels (CR McClain, Ed). *PLoS ONE* **4**: e6485.
- Fiala-Medioni A. 1988. Synthèse sur les adaptations structurales liées à la nutrition des mollusques bivalves des sources hydrothermales profondes. *Oceanologica acta N°SP*: 173–179.
- Fiala-Médioni A, Métivier C, Herry A, Le Pennec M. 1986. Ultrastructure of the gill of the hydrothermal-vent mytilid *Bathymodiolus* sp. *Marine Biology* **92**: 65–72.
- Fiala-Medioni A, Michalski J-C, Jollès J, Alonso C, Montreuil J. 1994. Lysosomal and lysozyme activities in the gill of bivalves from deep hydrothermal vents. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **317**: 239–244.
- Fiala-Médioni A, McKiness Z, Dando P, Boulegue J, Mariotti A, Alayse-Danet A, Robinson J, Cavanaugh C. 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. *Marine Biology* **141**: 1035–1043.
- Fisher CR, Childress JJ, Oremland RS, Bidigare RR. 1987. The importance of methane and thiosulfate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Marine Biology* **96**: 59–71.
- Fisher CR, Brooks JM, Vodenichar JS, Zande JM, Childress JJ, others. 1993. The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *Marine Ecology* **14**: 277–289.
- Foster JS, McFall-Ngai MJ. 1998. Induction of apoptosis by cooperative bacteria in the morphogenesis of host epithelial tissues. *Development genes and evolution* **208**: 295–303.
- Frenkiel L, Mouëza M. 1995. Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae). *Zoomorphology* **115**: 51–61.



- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, et al. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation* **19**: 107–120.
- Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, et al. 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation* **22**: 58–73.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, et al. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* **25**: 486–541.
- Gates RD, Baghdasarian G, Muscatine L. 1992. Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: Implications for coral bleaching. *The Biological Bulletin* **182**: 324–332.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* **119**: 493–501.
- Glücksman A. 1951. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* **26**: 59–86.
- Goedken M, Morsey B, Sunila I, Dungan C, De Guise S. 2005. The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and perkinsus marinus. *Journal of Shellfish Research* **24**: 177–183.
- Golstein P, Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* **32**: 37–43.
- Gómez-Mendikute A, Elizondo M, Venier P, Cajaraville MP. 2005. Characterization of mussel gill cells *in vivo* and *in vitro*. *Cell and Tissue Research* **321**: 131–140.
- Gratzner HG. 1982. Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**: 474–475.
- Grizel H, Auffret M, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Eds.). 2003. *Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins =: An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs*. Inframer ; Diffusion, ALT Brest: Plouzané, France : Brest.
- Grönlund M-M, Lehtonen O-P, Eerola E, Kero P. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: Permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **28**: 19–25.
- Gros O, Gaill F. 2007. Extracellular bacterial association in gills of «wood mussels». *Cahier de biologie Marine* **48**: 103–109.
- Gros O, Frenkiel L, Moueza M. 1997. Embryonic, larval, and post-larval development in the symbiotic clam *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology* **116**: 86.
- Gros O, Elisabeth NH, Gustave SDD, Caro A, Dubilier N. 2012. Plasticity of symbiont acquisition throughout the life cycle of the shallow-water tropical lucinid *Codakia orbiculata* (Mollusca: Bivalvia): Symbiont acquisition in lucinid clams. *Environmental Microbiology* **14**: 1584–1595.

- Guezi H, Boutet I, Tanguy A, Lallier FH. 2013. The potential implication of apoptosis in the control of chemosynthetic symbionts in *Bathymodiolus thermophilus*. *Fish & Shellfish Immunology* **34**: 1709.
- Guezi H, Boutet I, Andersen AC, Lallier FH, Tanguy A. 2014. Comparative analysis of symbiont ratios and gene expression in natural populations of two *Bathymodiolus* mussel species. *Symbiosis* **63**: 19–29.
- Häcker G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* **301**: 5–17.
- 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*. *The ISME journal* **2**: 284–292.
- Hans F, Dimitrov S. 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* **20**: 3021–3027.
- Harmer TL, Rotjan RD, Nussbaumer AD, Bright M, Ng AW, DeChaine EG, Cavanaugh CM. 2008. Free-living tube worm endosymbionts found at deep-sea vents. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3895–3898.
- Hauton C, Brown A, Thatje S, Mestre NC, Bebianno MJ, Martins I, Bettencourt R, Canals M, Sanchez-Vidal A, Shillito B, et al. 2017. Identifying Toxic Impacts of Metals Potentially Released during Deep-Sea Mining—A Synthesis of the Challenges to Quantifying Risk. *Frontiers in Marine Science* **4**.
- Hayward PJ, Nelson-Smith T, Shields C, Leraut P. 2014. *Guide des bords de mer: Mer du Nord, Manche, Atlantique, Méditerranée*. Delachaux et Niestlé: Paris.
- Helm MM, Bourne N, Lovatelli A. 2004. *Hatchery culture of bivalves: a practical manual*. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome.
- Henzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**: 348–360.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770–776.
- Hengartner MO, Horvitz R. 1994. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**: 665–676.
- Hessler RR, Smithey WM, Boudrias MA, Keller CH, Lutz RA, Childress JJ. 1988. Temporal change in megafauna at the Rose Garden hydrothermal vent (Galapagos Rift; eastern tropical Pacific). *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* **35**: 1681–1709.
- Jennings PC, Cox GC, Monahan LG, Harry EJ. 2011. Super-resolution imaging of the bacterial cytokinetic protein FtsZ. *Micron* **42**: 336–341.
- Jetten MSM. 2008. The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology* **10**: 2903–2909.
- Kádár E, Costa V. 2006. First report on the micro-essential metal concentrations in bivalve shells from deep-sea hydrothermal vents. *Journal of Sea Research* **56**: 37–44.

- 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*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **318**: 99–110.
- Kádár E, Santos RS, Powell JJ. 2006. Biological factors influencing tissue compartmentalization of trace metals in the deep-sea hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus* at geochemically distinct vent sites of the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Research* **101**: 221–229.
- Kádár E, Davis SA, Lobo-da-Cunha A. 2008. Cytoenzymatic investigation of intracellular digestion in the symbiont-bearing hydrothermal bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Biology* **153**: 995–1004.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation* **18**: 571–580.
- van Katwijk MM, Bos AR, de Jonge VN, Hanssen LSAM, Hermus DCR, de Jong DJ. 2009. Guidelines for seagrass restoration: Importance of habitat selection and donor population, spreading of risks, and ecosystem engineering effects. *Marine Pollution Bulletin* **58**: 179–188.
- Kelley JT, Dickson SM, Belknap DF, Barnhardt WA, Henderson M. 1994. Giant sea-bed pockmarks: Evidence for gas escape from Belfast Bay, Maine. *Geology* **22**: 59.
- Kenk VC, Wilson BR. 1985. A new mussel (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents in the Galapagos Rift zone. *Malacologia* **26**: 253–271.
- Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, Apetoh L, Aranda F, Barnaba V, Bloy N, et al. 2014. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncotarget* **3**: e955691.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**: 239.
- Kim SM, Kang S-W, Kwon O-N, Chung D, Pan C-H. 2012. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **55**: 477–483.
- Kiss T. 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* **15**: 313–321.
- Klionsky DJ. 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 931–937.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**: 1–222.
- Kloiber U, Pflugfelder B, Rinke C, Bright M. 2009. Cell proliferation and growth in *Zoothamnium niveum* (Oligohymenophora, Peritrichida): Thiotrophic bacteria symbiosis. *Symbiosis* **47**: 43–50.
- Klose J, Polz MF, Wagner M, Schimak MP, Gollner S, Bright M. 2015. Endosymbionts escape dead hydrothermal vent tubeworms to enrich the free-living population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 11300–11305.

- Klose J, Aistleitner K, Horn M, Krenn L, Dirsch V, Zehl M, Bright M. 2016. Trophosome of the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* Inhibits bacterial growth. *PLOS ONE* **11**: e0146446.
- Koropatnick TA, Kimbell JR, McFall-Ngai MJ. 2007. Responses of host hemocytes during the initiation of the squid-Vibrio symbiosis. *The Biological Bulletin* **212**: 29–39.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, et al. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1463–1467.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, et al. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation* **16**: 3–11.
- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. 1998. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **46**: 327–334.
- Lallier F. 2013. BIOBAZ 2013 cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Lalou C. 1991. Deep-sea hydrothermal venting: A recently discovered marine system. *Journal of Marine Systems* **1**: 403–440.
- Laming SR, Duperron S, Gaudron SM, Hilário A, Cunha MR. 2015. Adapted to change: The rapid development of symbiosis in newly settled, fast-maturing chemosymbiotic mussels in the deep sea. *Marine Environmental Research* **112**: 100–112.
- Laming SR, Gaudron SM, Duperron S. 2018. Lifecycle Ecology of Deep-Sea Chemosymbiotic Mussels: A Review. *Frontiers in Marine Science* **5**.
- Lane DJ. 1991. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York.
- Le Bris N, Duperron S. 2010. Chemosynthetic communities and biogeochemical energy pathways along the Mid-Atlantic Ridge: The case of *Bathymodiolus azoricus*. In *Geophysical Monograph Series*, Rona PA, , Devey CW, , Dymont J, , Murton BJ (eds). American Geophysical Union: Washington, D. C.; 409–429.
- Le Bris N, Govenar B, Le Gall C, Fisher CR. 2006. Variability of physico-chemical conditions in 9°50'N EPR diffuse flow vent habitats. *Marine Chemistry* **98**: 167–182.
- Le Pennec M, Hily A. 1984. Anatomie, structure et ultrastructure de la branchie d'un Mytilidae des sites hydrothermaux du pacifique oriental. *Oceanologica acta* **7**: 517–523.
- Le Pennec M, Beninger PG, Herry A. 1995. Feeding and digestive adaptations of bivalve molluscs to sulphide-rich habitats. *Comparative Biochemistry and Physiology IIIA*: 183–189.
- Lechaire J-P, Frébourg G, Gaill F, Gros O. 2008. In situ characterization of sulphur in gill-endosymbionts of the shallow water lucinid *Codakia orbicularis* (Linné, 1758) by high-pressure cryofixation and EFTEM microanalysis. *Marine Biology* **154**: 693–700.
- Lee K-H, Ruby EG. 1994. Effect of the squid host on the abundance and distribution of symbiotic *Vibrio fischeri* in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 7.

- Leisch N, Verheul J, Heindl NR, Gruber-Vodicka HR, Pende N, den Blaauwen T, Bulgheresi S. 2012. Growth in width and FtsZ ring longitudinal positioning in a gammaproteobacterial symbiont. *Current Biology* **22**: R831–R832.
- Lesser MP. 2004. Experimental biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **300**: 217–252.
- Lesser MP. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* **68**: 253–278.
- Levine B, Sinha SC, Kroemer G. 2008. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* **4**: 600–606.
- Li DW, Yang Q, Chen JT, Zhou H, Liu RM, Huang XT. 2005. Dynamic distribution of Ser-10 phosphorylated histone H3 in cytoplasm of MCF-7 and CHO cells during mitosis. *Cell research* **15**: 120.
- Little CTS, Vrijenhoek RC. 2003. Are hydrothermal vent animals living fossils? *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 582–588.
- Liu Y, Levine B. 2015. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death & Differentiation* **22**: 367–376.
- Lopez-Garcia P, Duperron S, Philippot P, Foriel J, Susini J, Moreira D. 2003. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* **5**: 961–976.
- Lorion J, Kiel S, Faure B, Kawato M, Ho SYW, Marshall B, Tsuchida S, Miyazaki J-I, Fujiwara Y. 2013. Adaptive radiation of chemosymbiotic deep-sea mussels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20131243–20131243.
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**: 220–230.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**: 741–752.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer K-H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 593–600.
- Martins I, Colaço A, Dando PR, Martins I, Desbruyères D, Sarradin P-M, Marques JC, Serrão-Santos R. 2008. Size-dependent variations on the nutritional pathway of *Bathymodiolus azoricus* demonstrated by a C-flux model. *Ecological Modelling* **217**: 59–71.
- McFall-Ngai M, Nyholm SV, Castillo MG. 2010. The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes*: *Vibrio fischeri* symbiosis. *Seminars in Immunology* **22**: 48–53.
- Milton DL. 2006. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology* **296**: 61–71.
- Mizushima N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes & Development* **21**: 2861–2873.

- Mone Y, Monnin D, Kremer N. 2014. The oxidative environment: a mediator of interspecies communication that drives symbiosis evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**: 20133112–20133112.
- Motta CM, Frezza V, Simoniello P. 2013. Caspase 3 in molluscan tissues: Localization and possible function. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **319**: 548–559.
- Muñoz-Pinedo C, Martin SJ. 2014. Autosis: a new addition to the cell death tower of babel. *Cell Death & Disease* **5**: e1319–e1319.
- Neef AB, Luedtke NW. 2014. An azide-modified nucleoside for metabolic labeling of DNA. *ChemBioChem* **15**: 789–793.
- Nussbaumer AD, Fisher CR, Bright M. 2006. Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* **441**: 345–348.
- Nyholm SV, McFall-Ngai M. 2004. The winnowing: establishing the squid–vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 632–642.
- Nyholm SV, Stabb EV, Ruby EG, McFall-Ngai MJ. 2000. Establishment of an animal-bacterial association: Recruiting symbiotic vibrios from the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 10231–10235.
- Ockelmann KW, Dinesen GE. 2011. Life on wood – the carnivorous deep-sea mussel *Idas argenteus* (Bathymodiolinae, Mytilidae, Bivalvia). *Marine Biology Research* **7**: 71–84.
- Olu K. 2011. WACS cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Olu-Le Roy K, Cosel R von, Hourdez S, Carney SL, Jollivet D. 2007. Amphi-Atlantic cold-seep Bathymodiolus species complexes across the equatorial belt. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **54**: 1890–1911.
- O’Mullan GD, Maas PAY, Lutz RA, Vrijenhoek RC. 2001. A hybrid zone between hydrothermal vent mussels (Bivalvia: Mytilidae) from the Mid-Atlantic Ridge. *Molecular Ecology* **10**: 2819–2831.
- Osada M, Nakamura S, Kijima A. 2007. Quantitative analysis of pattern of gonial proliferation during sexual maturation in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science* **73**: 1318–1324.
- Page HM, Fisher CR, Childress JJ. 1990. Role of filter-feeding in the nutritional biology of a deep-sea mussel with methanotrophic symbionts. *Marine Biology* **104**: 251–257.
- Page HM, Fiala-Medioni A, Fisher CR, Childress JJ. 1991. Experimental evidence for filter-feeding by the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* **38**: 1455–1461.
- Pasparakis M, Vandenabeele P. 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* **517**: 311–320.
- Paull CK, Hecker B, Commeau R, Freeman-Lynde RP, Neumann C, Corso WP, Golubic S, Hook JE, Sikes E, Curray J. 1984. Biological communities at the Florida escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science* **226**: 965–967.

- Pende N, Leisch N, Gruber-Vodicka HR, Heindl NR, Ott J, den Blaauwen T, Bulgheresi S. 2014. Size-independent symmetric division in extraordinarily long cells. *Nature Communications* **5**: 4803.
- Perez S. 2006. Nitric oxide and cnidarian bleaching: an eviction notice mediates breakdown of a symbiosis. *Journal of Experimental Biology* **209**: 2804–2810.
- Petersen JM, Osvatic J. 2018. Microbiomes *In Natura* : Importance of Invertebrates in Understanding the Natural Variety of Animal-Microbe Interactions. *mSystems* **3**.
- Petersen JM, Zielinski FU, Pape T, Seifert R, Moraru C, Amann R, Hourdez S, Girguis PR, Wankel SD, Barbe V, et al. 2011. Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* **476**: 176–180.
- Peyer SM, Kremer N, McFall-Ngai MJ. 2018. Involvement of a host Cathepsin L in symbiont-induced cell death. *MicrobiologyOpen*: e00632.
- Pflugfelder B, Cary SC, Bright M. 2009. Dynamics of cell proliferation and apoptosis reflect different life strategies in hydrothermal vent and cold seep vestimentiferan tubeworms. *Cell and Tissue Research* **337**: 149–165.
- Pile AJ, Young CM. 1999. Plankton availability and retention efficiencies of cold-seep symbiotic mussels. *Limnology and Oceanography* **44**: 1833–1839.
- Piquet B, Shillito B, Lallier FH, Duperron S, Andersen AC. 2018. High rates of apoptosis visualised in the symbiont-bearing gills of deep-sea chemosynthetic mussels (genus *Bathymodiolus*). *Submitted*.
- Ponnudurai R, Kleiner M, Sayavedra L, Petersen JM, Moche M, Otto A, Becher D, Takeuchi T, Satoh N, Dubilier N, et al. 2016. Metabolic and physiological interdependencies in the *Bathymodiolus azoricus* symbiosis. *The ISME Journal*.
- Powell MA, Somero GN. 1986. Adaptations to sulfide by hydrothermal vent animals: Sites and mechanisms of detoxification and metabolism. *The Biological Bulletin* **171**: 274–290.
- Pradillon F. 2012. High hydrostatic pressure environments. In *Life at extremes: environments, organisms and strategies for survival*, Bell EM (ed). CABI: Wallingford; 271–295.
- Pradillon F, Gaill F. 2007. Pressure and life: some biological strategies. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **6**: 181–195.
- Pradillon F, Shillito B, Chervin J-C, Hamel G, Gaill F. 2004. Pressure vessels for *in vivo* studies of deep-sea fauna. *High Pressure Research* **24**: 237–246.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**: D590–D596.
- Rajasabapathy R, Mohandass C, Colaco A, Dastager SG, Santos RS, Meena RM. 2014. Culturable bacterial phylogeny from a shallow water hydrothermal vent of Espalamaca (Faial, Azores) reveals a variety of novel taxa. *CURRENT SCIENCE* **106**: 12.

- Raulfs EC, Macko SA, Van Dover CL. 2004. Tissue and symbiont condition of mussels (*Bathymodiolus thermophilus*) exposed to varying levels of hydrothermal activity. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **84**: 229–234.
- Ravaux J, Hamel G, Zbinden M, Tasiemski AA, Boutet I, Léger N, Tanguy A, Jollivet D, Shillito B. 2013. Thermal limit for metazoan life in question: *In vivo* heat tolerance of the pompeii worm (N Nikolaidis, Ed). *PLoS ONE* **8**: e64074.
- Richier S, Furla P, Plantivaux A, Merle P-L, Allemand D. 2005. Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* **208**: 277–285.
- Richier S, Sabourault C, Courtiade J, Zucchini N, Allemand D, Furla P. 2006. Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *FEBS Journal* **273**: 4186–4198.
- Riou V, Halary S, Duperron S, Bouillon S, Elskens M, Bettencourt R, Santos RS, Dehairs F, Colaço A. 2008. Influence of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>S availability on symbiont distribution, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences* **5**: 1681–1691.
- Riou V, Colaço A, Bouillon S, Khripounoff A, Dando P, Mangion P, Chevalier E, Korntheuer M, Santos R, Dehairs F. 2010a. Mixotrophy in the deep sea: a dual endosymbiotic hydrothermal mytilid assimilates dissolved and particulate organic matter. *Marine Ecology Progress Series* **405**: 187–201.
- Riou V, Duperron S, Halary S, Dehairs F, Bouillon S, Martins I, Colaço A, Serrão Santos R. 2010b. Variation in physiological indicators in *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae) at the Menez Gwen Mid-Atlantic Ridge deep-sea hydrothermal vent site within a year. *Marine Environmental Research* **70**: 264–271.
- Rodrigues CF, Laming SR, Gaudron SM, Oliver G, Le Bris N, Duperron S. 2015. A sad tale: has the small mussel *Idas argenteus* lost its symbionts?: Has *I. argenteus* Lost its Symbionts. *Biological Journal of the Linnean Society* **114**: 398–405.
- Romero A, Novoa B, Figueras A. 2015. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish & Shellfish Immunology* **46**: 79–87.
- Salerno JL, Macko SA, Hallam SJ, Bright M, Won Y-J, McKiness Z, Van Dover CL. 2005. Characterization of symbiont populations in life-history stages of mussels from chemosynthetic environments. *The Biological Bulletin* **208**: 145–155.
- Sarradin P-M, Cannat M. 2017. MOMARSAT2017 cruise, Pourquoi pas ? R/V.
- Sarradin P-M, Leroy KO, Ondreas H, Sibuet M, Klages M, Fouquet Y, Savoye B, Drogou J-F, Michel J-L. 2002. Evaluation of the first year of scientific use of the French ROV Victor 6000. *IEEE*; 11–16.
- Savoye B, Babonneau N, Dennielou B, Bez M. 2009. Geological overview of the Angola–Congo margin, the Congo deep-sea fan and its submarine valleys. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **56**: 2169–2182.
- Sawyer SJ, Muscatine L. 2001. Cellular basis of cnidarian bleaching. *The Journal of Experimental Biology*: 3443–3456.



- Schafer KA. 1998. The cell cycle: A review. *Vet Pathol* **35**: 461–478.
- Schafer ZT, Kornbluth S. 2006. The apoptosome: Physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Developmental Cell* **10**: 549–561.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews* **90**: 859–904.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body.
- Shank TM, Fornari DJ, Von Damm KL, Lilley MD, Haymon RM, Lutz RA. 1998. Temporal and spatial patterns of biological community development at nascent deep-sea hydrothermal vents (9°50'N, East Pacific Rise). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **45**: 465–515.
- Shillito B, Jollivet D, Sarradin P-M, Rodier P, Lallier F, Desbruyères D, Gaill F. 2001. Temperature resistance of *Hesiolyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker walls. *Marine Ecology Progress Series* **216**: 141–149.
- Shillito B, Hamel G, Duchi C, Cottin D, Sarrazin J, Sarradin P-M, Ravaux J, Gaill F. 2008. Live capture of megafauna from 2300m depth, using a newly designed Pressurized Recovery Device. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **55**: 881–889.
- Shillito B, Gaill F, Ravaux J. 2014. The IPOCAMP pressure incubator for deep-sea fauna. *J. Mar. Sci. Technol.* **22**: 97–102.
- Sibuet M, Olu K. 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep Sea Research Part II* **45**: 517–567.
- Sibuet M, Roy KO-L. 2002. Cold seep communities on continental margins: Structure and quantitative distribution relative to geological and fluid venting patterns. In *Ocean Margin Systems*, Wefer G, Billett D, Hebbeln D, Jørgensen BB, Schlüter M, van Weering TCE (eds). Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; 235–251.
- Sokolova IM. 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *Journal of Experimental Biology* **207**: 3369–3380.
- Sokolova IM. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal* **6**: 49–58.
- Steen RG, Muscatine L. 1987. Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. *The Biological Bulletin* **172**: 246–263.
- Streams ME, Fisher CR, Fiala-Medioni A. 1997. Methanotrophic symbiont location and fate of carbon incorporated from methane in a hydrocarbon seep mussel. *Marine Biology* **129**: 465–476.
- Sun Y, Wang M, Li L, Zhou L, Wang X, Zheng P, Yu H, Li C, Sun S. 2017. Molecular identification of methane monooxygenase and quantitative analysis of methanotrophic endosymbionts under laboratory maintenance in *Bathymodiolus platifrons* from the South China Sea. *PeerJ* **5**: e3565.
- Sunila I, LaBanca J. 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**: 163–170.

- Szafranski KM, Deschamps P, Cunha MR, Gaudron SM, Duperron S. 2015a. Colonization of plant substrates at hydrothermal vents and cold seeps in the northeast Atlantic and Mediterranean and occurrence of symbiont-related bacteria. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Terahara K, Takahashia K. 2008. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *curr pharm des* **14**: 131–7.
- Thubaut J, Puillandre N, Faure B, Cruaud C, Samadi S. 2013. The contrasted evolutionary fates of deep-sea chemosynthetic mussels (Bivalvia, Bathymodiolinae). *Ecology and Evolution* **3**: 4748–4766.
- Tivey MK, Humphris SE, Thompson G, Hannington MD, Rona PA. 1995. Deducing patterns of fluid flow and mixing within the TAG active hydrothermal mound using mineralogical and geochemical data. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* **100**: 12527–12555.
- de Torres C, Munell F, Ferrer I, Reventos J, Macaya A. 1997. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neuroscience Letters* **230**: 1–4.
- Tunnicliffe V. 1991. The biology of hydrothermal vents: Ecology and evolution. *Oceanography and marine biology: an annual review* **29**: 319–407.
- Tunnicliffe V. 1992. Hydrothermal-vent communities of the deep sea. *American Scientist* **80**: 336–349.
- Van Dover CL. 2014. Impacts of anthropogenic disturbances at deep-sea hydrothermal vent ecosystems: A review. *Marine Environmental Research* **102**: 59–72.
- Van Dover CL, Aharon P, Bernhard JM, Caylor E, Doerries M, Flickinger W, Gilhooly W, Goffredi SK, Knick KE, Macko SA, et al. 2003. Blake Ridge methane seeps: characterization of a soft-sediment, chemosynthetically based ecosystem. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **50**: 281–300.
- Vaughan S, Wickstead B, Gull K, Addinall SG. 2004. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of Archaea, Bacteria, and Eukaryota. *Journal of Molecular Evolution* **58**: 19–29.
- Vigneron A, Masson F, Vallier A, Balmand S, Rey M, Vincent-Monégat C, Aksoy E, Aubailly-Giraud E, Zaidman-Rémy A, Heddi A. 2014. Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. *Current Biology* **24**: 2267–2273.
- Vinella D, D’Ari R. 1995. Overview of controls in the *Escherichia coli* cell cycle. *BioEssays* **17**: 527–536.
- Von Cosel R, Comtet T, Krylova EM. 1999. Bathymodiolus (Bivalvia: Mytilidae) from Hydrothermal Vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *The Veliger* **42**: 218–248.
- Voskuil JL, Westerbeek CA, Wu C, Kolk AH, Nanninga N. 1994. Epitope mapping of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ with monoclonal antibodies. *Journal of bacteriology* **176**: 1886–1893.
- Weis VM. 2008. Cellular mechanisms of cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology* **211**: 3059–3066.

- 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. *The ISME journal* **7**: 1244–1247.
- Wentrup C, Wendeberg A, Schimak M, Borowski C, Dubilier N. 2014. Forever competent: deep-sea bivalves are colonized by their chemosynthetic symbionts throughout their lifetime: Symbiont colonization in gills of deep-sea bivalves. *Environmental Microbiology* **16**: 3699–3713.
- Wicker C, Nardon P. 1982. Development responses of symbiotic and aposymbiotic weevils *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, curculionidae) to a diet supplemented with aromatic amino acids. *Journal of Insect Physiology* **28**: 1021–1024.
- Won Y-J, 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*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6785–6792.
- Wong YH, Sun J, He LS, Chen LG, Qiu J-W, Qian P-Y. 2015. High-throughput transcriptome sequencing of the cold seep mussel *Bathymodiolus platifrons*. *Scientific Reports* **5**: 16597.
- Wood-Charlson EM, Hollingsworth LL, Krupp DA, Weis VM. 2006. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. *Cellular Microbiology* **8**: 1985–1993.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 635–645.
- Yellowlees D, Rees TAV, Leggat W. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, Cell & Environment* **31**: 679–694.
- Yuan J, Horvitz HR. 1990. The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Developmental Biology* **138**: 33–41.
- Yuan J, Najafov A, Py BF. 2016. Roles of Caspases in Necrotic Cell Death. *Cell* **167**: 1693–1704.
- Zaldibar B, Cancio I, Marigomez I. 2004. Circatidal variation in epithelial cell proliferation in the mussel digestive gland and stomach. *Cell and Tissue Research* **318**: 395–402.
- Zhao S-J, Hanson RS. 1984. Variants of the obligate methanotroph isolate 761M capable of growth on glucose in the absence of methane. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* **48**: 807–812.
- Zheng P, Wang M, Li C, Sun X, Wang X, Sun Y, Sun S. 2017. Insights into deep-sea adaptations and host-symbiont interactions: a comparative transcriptome study on *Bathymodiolus* mussels and their coastal relatives. *Molecular Ecology*: 5133–5148.
- Zielinski FU, Pernthaler A, Duperron S, Raggi L, Giere O, Borowski C, Dubilier N. 2009. Widespread occurrence of an intranuclear bacterial parasite in vent and seep bathymodiolin mussels. *Environmental Microbiology* **11**: 1150–1167.

## 7 ANNEXES

---

### 7.1 MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE MAINTENANCE DE *BATHYMODIOLUS AZORICUS* SANS SYMBIOTES A LONG TERME

Afin de vérifier si les moules consomment bien et tirent profit des microalgues, une partie de ces moules est nourrie avec une souche de *T-Isopchrysis* enrichie en carbone 13 et azote 15 afin de vérifier l'assimilation des microalgues par ces moules. Ces expériences ont été conduites avec les conseils du Dr. Pascal Riera, spécialiste en mesures de spectrométrie de masse avec des isotopes stables, de l'équipe Ecogéochimie et Fonctionnement des Ecosystèmes Benthiques à la Station Biologique de Roscoff. Dix moules, ainsi nourries pendant 10 jours, ont été disséquées en séparant la branchie, les glandes digestives et le manteau. Cinq autres moules ont été disséquées et préparées de la même façon sans être nourries avec les microalgues marquées afin d'être utilisées comme témoins. La longueur moyenne des moules est de  $5.9\text{cm} \pm 1\text{cm}$ . Afin de vérifier si les moules se sont nourries des microalgues, ces différents tissus sont en cours d'analyse, car le spectromètre était malheureusement en panne jusqu'à récemment, mais il vient d'être remis en fonction.

#### Taux de filtration des microalgues

L'objet de cette expérimentation était de comparer les taux de filtration des bathymodiales avec ceux des moules côtières, pour voir si, à taille de moule égale, les capacités de filtration d'une moule aposymbiotique sont similaires à celles d'une moule côtière. Au RAS, les deux espèces ont été maintenues à 8°C dans de l'EDMF à  $0.22\mu\text{m}$  et nourries avec des *T-Isopchrysis*. L'espèce *B. azoricus* ramenée de Menez Gwen a été maintenue 8 mois et *Mytilus edulis* de Bloscon maintenue 1 mois dans ces conditions avant l'expérience. Les coquilles des moules ont été mesurées avant l'expérimentation pour que les tailles des différents individus et des différentes espèces soient équivalentes (tableau 10). Il est important pour comparer les espèces que le volume de chacun soit proche.

Tableau 10 : Taille des individus ayant servi à l'expérience de filtration.

Taille en mm	<i>Mytilus edulis</i>	<i>Bathymodiolus azoricus</i>	Coquille vide
Longueur	49-48-45	50-46-49	50-50-44
Largeur	27-27-25	24-23-25	25-26-24
Epaisseur	18-20-17	19-17-18	19-19-18

Dans des ballons à fond rond de 2L, trois lots de moules de 3 individus chacun ont été placés dans de l'eau de mer filtrée à 0.22µm, sans nourriture. Le premier ballon contenait trois *Mytilus edulis*, le deuxième ballon, trois *Bathymodiolus azoricus* et, dans le troisième ballon, se trouvaient des coquilles de bathymodiales vides qui ont été recollées en laissant un espace pour mimer l'ouverture d'une moule. Cette reconstitution de coquilles de bathymodiales a permis de faire un ballon témoin afin de suivre la sédimentation naturelle par gravité des microalgues sur des surfaces de coquilles similaires à celles des deux autres ballons (figure 63 E). Un bullage doux a été effectué afin d'assurer constamment une remise en suspension des microalgues. L'eau de mer a été maintenue à une température de 8°C pendant toute l'expérimentation. Des microalgues du genre *T-isochrysis* ont été ajoutées dans les ballons pour obtenir une concentration d'environ 400 000 cellules par ml (figure 63). Toutes les deux heures pendant 12h, 1ml de chaque ballon a été prélevé et fixé avec 0.25% de cacodylate pour conserver la forme des microalgues afin de mesurer leur concentration en cytométrie en flux. Un dernier prélèvement a été effectué 24h après le début de l'expérience. Les prélèvements d'eau ont été analysés au cytomètre en flux avec Dominique Marie, ingénieur de recherche de l'équipe Procaryotes Phototropiques Marins, à la Station Biologique de Roscoff. L'objectif était de suivre la densité des microalgues dans les prélèvements successifs. Par la suite, nous avons pu calculer, par différence avec le prélèvement source de nourrissage et en soustrayant le taux de sédimentation naturelle (ballon 3), le nombre de microalgues consommées par chacune des deux espèces de moules au cours du temps.

Le résultat de l'expérience de filtration des microalgues dans les ballons contenant des moules montre qu'au bout de 2h, le ballon des moules côtières est transparent et qu'elles ont donc filtré la grande majorité des microalgues ajoutées, alors que les ballons du témoin et des bathymodiales ne changent pas de couleur, prouvant la présence permanente des microalgues. Les mesures au cytomètre en flux montrent que la concentration des microalgues dans le ballon des *Mytilus edulis* passe de 410,000cell/ml à 100,000cell/ml au bout de 2h (Figure 63) et après

4h, les microalgues ne sont quasiment plus détectables dans leur ballon. A l'inverse, dans le ballon du témoin et des bathymodioles, la concentration en microalgues ne change quasiment pas, et passe de 490,000 à 440,000 cell/mL au bout de 24 heures (figure 64).

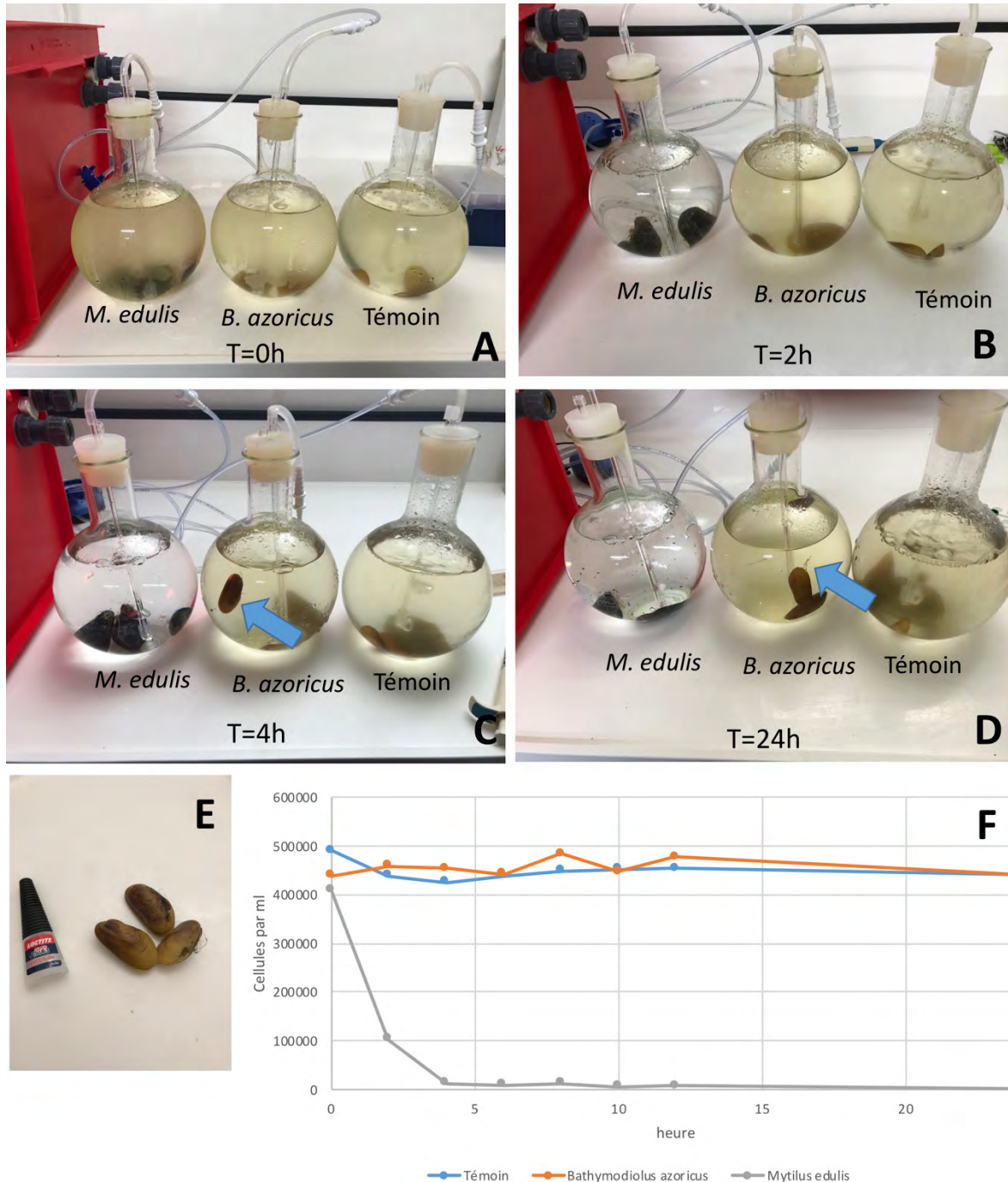


Figure 64 : Expérience de filtration chez *Bathymodiolus azoricus* et *Mytilus edulis*. A) Photo des ballons contenant, de gauche à droite : 3 *Mytilus edulis*, 3 *Bathymodiolus azoricus* et 3 coquilles vides. La photo a été prise au début de l'expérience et les 3 ballons ont la même couleur verte due aux microalgues. B) Après 2h l'eau du ballon des *Mytilus edulis* s'est éclaircie. C) Après 4h, on peut noter que l'eau du ballon des moules côtières est totalement transparente. D) Photo prise à la fin de l'expérience. Le ballon des moules des sources hydrothermales est toujours coloré en vert tout comme le ballon témoin. La

flèche montre une bathymodiole qui se déplace dans le ballon, preuve que les moules se sont ouvertes pendant l'expérience. E) Photo des coquilles vides et de la colle qui a servi à fabriquer les fausses moules. F) Graphique montrant la concentration en microalgues dans les trois ballons pendant 24h.

Une deuxième expérience a été menée dans les mêmes conditions, mais avec une concentration plus faible de microalgues, soit 7000 cellules/ml, *i.e.* la même concentration que dans l'article de Page (Page *et al.*, 1990) et sur un temps plus long (5 jours au lieu de 24h). Après plus d'investigations sur l'eau de l'aquarium, il s'avère que le cytomètre en flux détecte deux populations de deux classes de tailles différentes dans l'eau. L'eau des bacs est filtrée à 0.22µm et peut donc laisser passer des bactéries de taille inférieure à 0.22µm. Par ailleurs, afin de réaliser le cycle de l'azote dans l'aquarium, des bactéries nitrifiantes ont été ajoutées. Donc, ces bactéries pourraient être l'une ou faire partie d'une de ces populations. Une expérience dans les ballons a été réalisée mais seulement avec de l'eau provenant des aquariums afin de suivre la diminution des bactéries présente dans l'eau.

Il semble que les bathymodiales ne filtrent que très peu les microalgues *T-isochrysis*, mais pourtant elles sont toujours en vie et actives dans les bassins après un an de ce régime. Par ailleurs l'observation à long terme des aquariums contenant les bathymodiales montre qu'ils restent toujours très propres, tandis que ceux contenant des moules côtières sont remplis de fèces.

Les bathymodiales sont décrites comme des moules mixotrophes (Riou *et al.*, 2010a). Des expériences de nourrissage sur des *Bathymodiolus thermophilus* avec de la matière organique dissoute et des bactéries avaient prouvé leur mixotrophie (Page *et al.*, 1991). D'autres expériences (Page *et al.*, 1990), sur des bathymodiales des suintements froids, ont montré que les moules étaient capables de filtrer des microalgues vertes du genre *Dunaliella tertiolecta*, une chlorophycée volvocale. Selon Algaebase, cette microalgue mesure en moyenne (5 à 18µm de long, avec une moyenne de 9.4µm, et 4.5 à 14.0µm de large et 7.1-8.2 µm), soit en moyenne une taille de 6x7µm. Ces tailles sont plutôt équivalentes, voire même supérieures à celle de *T-Ischrysis* (4 à 6µm de diamètre), que nous avons utilisée pour les nourrir. Par ailleurs, les bivalves peuvent normalement faire des pseudofèces avec ce qu'ils ne filtrent pas. Cependant, comme signalé plus haut, les aquariums des bathymodiales sont restés très propres. Il est donc difficile de conclure pourquoi si peu de *T-isochrysis* sont filtrées au bout de 24h et si les bathymodiales profitent de cette nourriture. C'est pourquoi les analyses en spectrométrie de masse seront intéressantes pour vérifier si une partie des *T-isochrysis* est métabolisée dans leurs tissus. Alternativement, les bathymodiales pourraient se nourrir des bactéries (Jetten, 2008)

présentes dans les aquariums (utilisées pour réaliser le cycle de l'azote) ou encore de matière organique dissoute.

Cette maintenance des bathymodioles en dehors de leur milieu naturel nous aura appris que ces moules sont capables de s'acclimater à un nouveau milieu en perdant leurs symbiotes et en changeant leurs branchies (figure 65). La faible mortalité des bathymodioles aposymbiotique de Menez Gwen (3 morts sur 200 sur une durée de 11 mois ) démontre que ce modèle peut être maintenu pour de longues durées avec une logistique assez simple. Les moules ne semblent pas léthargiques et on peut les observer se déplacer à travers tout l'aquarium (figure 66). La dernière dissection effectuée sur ces moules pendant ma thèse a révélé des moules qui produisaient des ovocytes (Figure 66 C), ce qui semblent être un bon signe de vitalité. Une maintenance des bathymodioles avec leurs symbiotes pourrait être envisagée et permettrait d'avoir des moules symbiotiques et aposymbiotiques en laboratoire, ce qui ouvrirait de nombreuses perspectives.

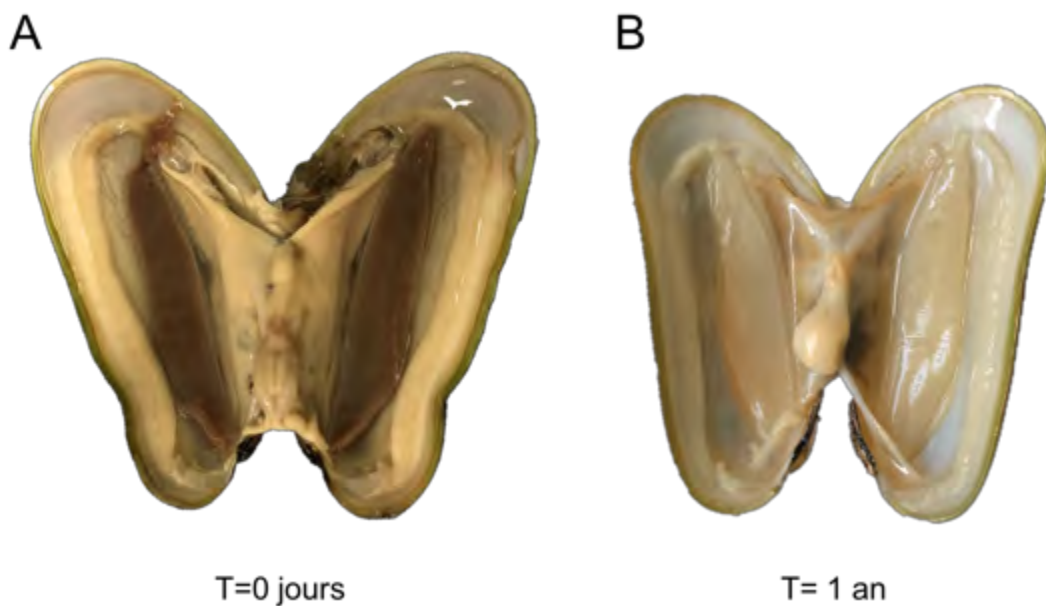


Figure 65 : Photo de *Bathymodiolus azoricus* du site Menez Gwen. A) La moule vient d'être remontée du site B) La moule a été maintenue dans un aquarium avec de l'eau de mer à 8°C nourrie avec des *T-Isochrysis* pendant 1 an.



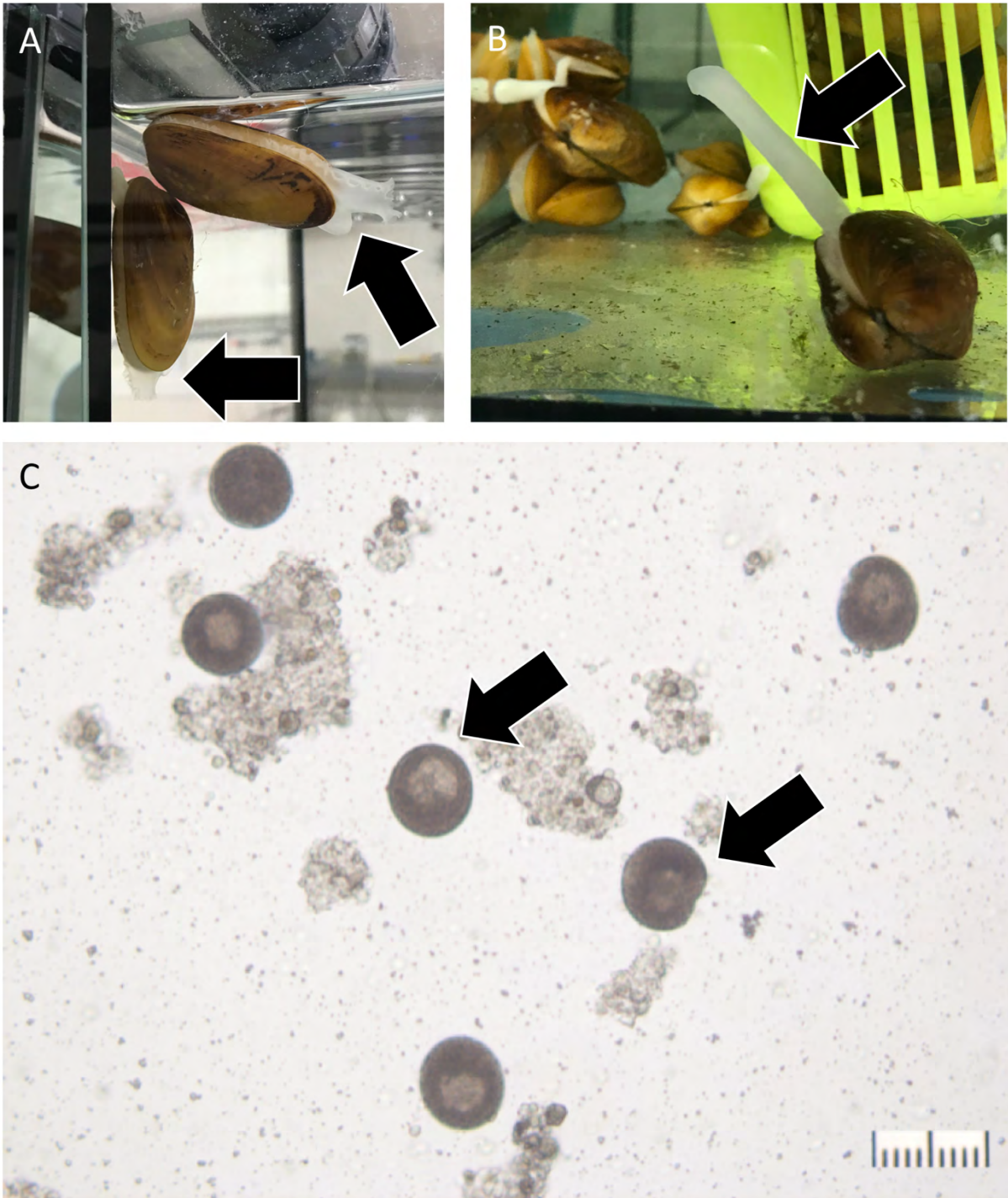


Figure 66 : Photo de la maintenance des *Bathymodiolus azoricus* en aquarium. A) Photo de deux bathymodiolés ouvertes. Les flèches montrent leurs siphons inhalant et exhalant sortis. B) Photo d'une bathymodiolé qui se déplace dans l'aquarium. La flèche montre le pied. C) Ovocytes primaires provenant d'un frottis de gonade de bathymodiolé maintenue 11 mois à Roscoff.

## 7.2 COLLABORATIONS DURANT LA THESE

### 7.2.1 Etude de l'expression de gènes codant pour l'apoptose chez *Bathymodiolus aff. boomerang* des suintements froids en collaboration avec Arnaud Tanguy.

Lors de la Campagne WACS en 2011 (Olu, 2011), des *B.aff. boomerang* des suintements froids ont été prélevées au sein d'une population du site REGAB (5°47.903 S, 9°42,671E, à -3153m de profondeur) et placées dans des cages en grillage puis déplacées en périphérie de leur site d'origine sur une zone basaltique, où l'environnement est dénué de fluide hydrothermal (absence de sulfures et/ou méthane). Les cages ont été laissées pendant plusieurs jours afin de déterminer s'il existait une relation entre le temps de privation du fluide et l'intensité de la dépuration (figure 67). Les cages ont ensuite été collectées puis remontées à bord. Une cage a été également remise sur site après 5 jours, afin d'étudier la possibilité de ré-acquisition des symbiotes. Ces moules sont utilisées dans la partie 4.1.2 afin d'étudier l'expression des gènes de l'apoptose et sa possible implication dans la diminution des symbiotes. Des individus de la population naturelle ont été utilisés dans la partie 4.1.1 afin de comparer la localisation des cellules apoptotiques dans les branchies de moules des suintements froids et des sources hydrothermales. Ces moules ont subi une dépressurisation à la remontée, mais c'est un comparatif entre les témoins sur site et les moules transloquées sur basalte, remontées dans les mêmes conditions de dépressurisation.

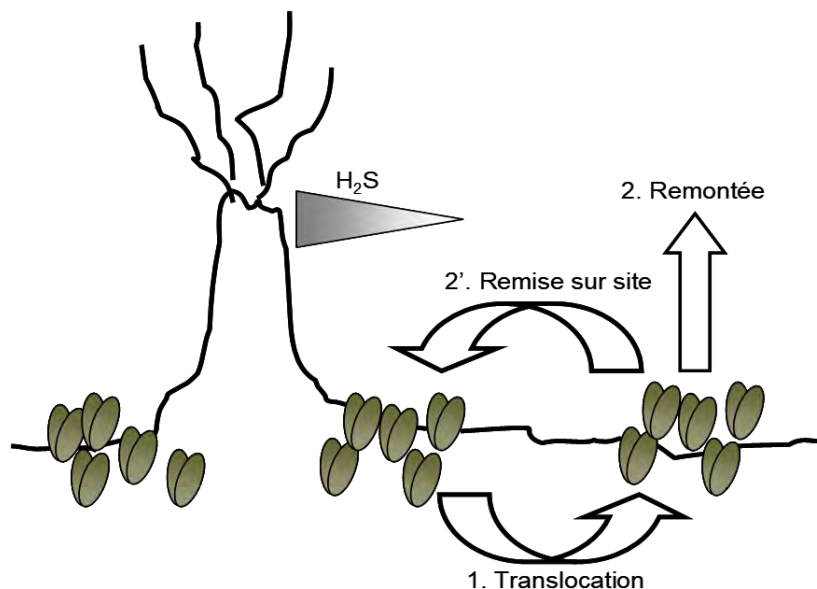


Figure 67 : Schéma expliquant l'expérimentation réalisée pendant la campagne WACS 2011

Chez une autre espèce de *Mytilidae* : *M. galloprovincialis*, les voies de l'apoptose ont été décrites et ont permis d'étudier les différentes voies de l'apoptose chez les *Bathymodiulus*. Nous avons étudié l'expression de 17 gènes chez *B. aff. boomerang* de la campagne WACS (Romero *et al.*, 2015). L'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose a été étudiée en qPCR et ci-dessous se trouve la liste des différents gènes étudiés lors de cette thèse. Cette partie s'intègre dans un projet en collaboration avec Arnaud Tanguy sur le système immunitaire des bathymodiales des sources hydrothermales et des suintements froids.

Gène	Facteur	Voie	Amorce Forward [5' → 3']	Amorce Reverse [5' → 3']
Bcl2-1	anti	intrinsèque	agctgggaccggtaatttagtagt	aaactcctgtttgaaacctctctcg
Bcl2-2	anti	intrinsèque	tgatgggaataataaactgggtag	actcgaaatccactggtctaaaatg
Bcl2-3	anti	intrinsèque	aggaaagacaagaaacctatccaa	caactgaaacgaaagtaggaaaagc
Bcl2-4	anti	intrinsèque	agctccacagagatcaaaaagaat	gacttggcagattatgcaggagat
Bax inhibitor	anti	intrinsèque	tgttgtagcgtacacatcattca	cctcccatgtaaaaaaggctctg
IAP1	anti	intrinsèque	atgccagggtccaaacattagagat	caactctccaaacgttctatctc
IAP2	anti	intrinsèque	tagacgatgtttaggtgacct	actgttgcaaaaattggtgtag
Kappa B-Ras	anti	extrinsèque	tgttggctcgtgacgtctagta	ggaaagaaacctgagtaaccagaaa
MIF	anti	cytokine	attgctgttgaaagtagcagcattc	agccaatttaaaggatcaactctgc
Apopstimul	pro	non connu	agaaattctctgtcactccagaat	gactgtcatgttccactctctt
Bax	pro	intrinsèque	cctacaggctctccattagaacac	tcagagaagaaactcttggctaca
AIF1 mito	pro	intrinsèque	tagaggcattggcattactttcc	gacattatttggcagagtacg
AIF3	pro	intrinsèque	acagtcagttctgtcattgggtg	gagtcttcttgggtgctatg
SMAC/DIABLO	pro	intrinsèque	tagaaacaagggtcactagtaaac	aaattctgactctgctgtaggc
Caspase 9	pro	intrinsèque	acacgtggctaatacactaaaaca	tctagatcagcaaaatgggaggtc
P38MAPK	pro	intrin/extrin	ggaaagtagtgcggcaattttg	aggggaaggagttgatactttg
P53 induced protein	pro	intrin/extrin	gaccagaaaattatgggagttgg	taatgtagtcaactctcctctc
P63/P73-1	pro	non connu	cccaaccataatgtcaacagcat	gtaaactcctctctgtgcaat
P63/P73-2	pro	non connu	ttaccagctcctcaaaatgggtga	ctcatttctggagatcctcaac
P63/P73-3	pro	non connu	cccaaccataatgtcaacagca	gtaaactcctctctgtgcaaa
TNF receptor associated factor 4	pro	extrinsèque	tcagggaactgtcatttgaagta	gggcaattgtagctgtagctctg
TNF alpha induced protein	pro	extrinsèque	caatcaaaaggagaagcatcagttg	tagggaatccaccaacgtttagtt
Caspase 2a1	pro	extrin/intrin	ccttggatgattggagataatggt	tgcttctctctgtcaattctgg
Caspase 6	pro	extrinsèque	aaaagacgggacaaggtaaaactg	caattaaatccaggacactgtgagg
Caspase 7a	pro	extrinsèque	gttcatggagcagaaaataccac	accttcaatagacaatcgatgc
Caspase 8	pro	extrinsèque	acgaaatgacgcagattatggtaga	tggcatgacactcttcttattctc
Caspase 10	pro	extrinsèque	gaactgtcactcaactagccttga	agaagtcagcctctctgtgattt

### 7.2.1 Contribution au projet SIBO

En février 2017, j'ai contribué au projet SIBO (**Characterization of Arctic Chemosynthetic animal communities**) sur l'identification des Siboglinidae de la mer de Norvège (voir-ci-après). J'ai montré au Dr. Arunima Sen (post-doctorante) les techniques FISH et pris les photos des résultats au confocal sur la plateforme de l'IBPS à Paris, puis j'ai préparé les planches photos (ci-après) pour le manuscrit. Ce travail a donné lieu à l'article (résumé ci-dessous), soumis à la revue PLOS One et en cours de révision avant publication.

# Cryptic frenulates are the dominant chemosymbiotrophic fauna at Arctic and high latitude Atlantic cold seeps

Arunima Sen<sup>1</sup>, Sébastien Duperron<sup>2,3</sup>, Stéphane Hourdez<sup>4</sup>, Bérénice Piquet<sup>2,4</sup>, Nelly Léger<sup>2</sup>, Andrey Gebruk<sup>3</sup>, Anne-Sophie Le Port<sup>4</sup>, Mette Marianne Svenning<sup>1,6</sup> and Ann C. Andersen<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centre for Arctic Gas Hydrate, Environment and Climate (CAGE), Department of Geosciences, UiT The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway

<sup>2</sup>Sorbonne Université, UMR7208 (MNHN, CNRS, IRD, UCN, UA) Biologie des organismes et écosystèmes aquatiques (BOREA), Paris, France

<sup>3</sup>Muséum National d'Histoire Naturelle – UMR7245 (MNHN CNRS) Mécanismes de Communication et Adaptation des Micro-organismes (MCAM), Paris, France.

<sup>4</sup>Sorbonne Université, CNRS - UMR7144 – Equipe Adaptation et Biologie des Invertébrés Marins en Conditions Extrêmes (ABICE) - Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France.

<sup>5</sup>Shirshov Institute of Oceanology, Moscow, Russia

<sup>6</sup>Department of Arctic Marine Biology, UiT The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway

## Abstract

We provide the first detailed identification of Barents Sea cold seep frenulate hosts and their symbionts. Mitochondrial COI sequence analysis, in combination with detailed morphological investigations through both light and electron microscopy was used for identifying frenulate hosts, and comparing them to *Oligobrachia haakonmosbiensis* and *Oligobrachia webbi*, two morphologically similar species known from the Norwegian Sea. Specimens from sites previously assumed to host *O. haakonmosbiensis* were included in our molecular analysis, which allowed us to provide a molecular perspective to the debate regarding species identity of these *Oligobrachia* worms, which did not exist before. Our results indicate that high Arctic seeps are inhabited by a species that though closely related to *Oligobrachia haakonmosbiensis*, is nonetheless distinct. We refer to this group as the *Oligobrachia* sp. CPL-clade, based on the colloquial names of the sites they are currently known to inhabit. Since members of the *Oligobrachia* sp. CPL-clade cannot be distinguished from *O. haakonmosbiensis* or *O. webbi* based on morphology, we suggest that a complex of cryptic *Oligobrachia* species inhabit seeps in the Arctic and Norwegian Sea. The symbionts of the *Oligobrachia* sp. CPL-clade were also found to be closely related to *O. haakonmosbiensis* symbionts, but genetically distinct. Fluorescent *in situ* hybridization and transmission electron micrographs revealed extremely dense populations of bacteria within the trophosome of

members of the *Oligobrachia* sp. CPL-clade, which is unusual for frenulates. Bacterial genes for sulfur oxidation were successfully amplified by PCR and small, round, or rod shaped bacteria, typical of siboglinid-associated sulfur-oxidizing bacteria, were seen on electron micrographs of trophosome bacteriocytes, suggesting that sulfide constitutes the main energy source. We hypothesize that specific, local geochemical conditions, in particular, high sulfide fluxes and concentrations could account for the unusually high symbiont densities in members of the *Oligobrachia* sp. CPL-clade.

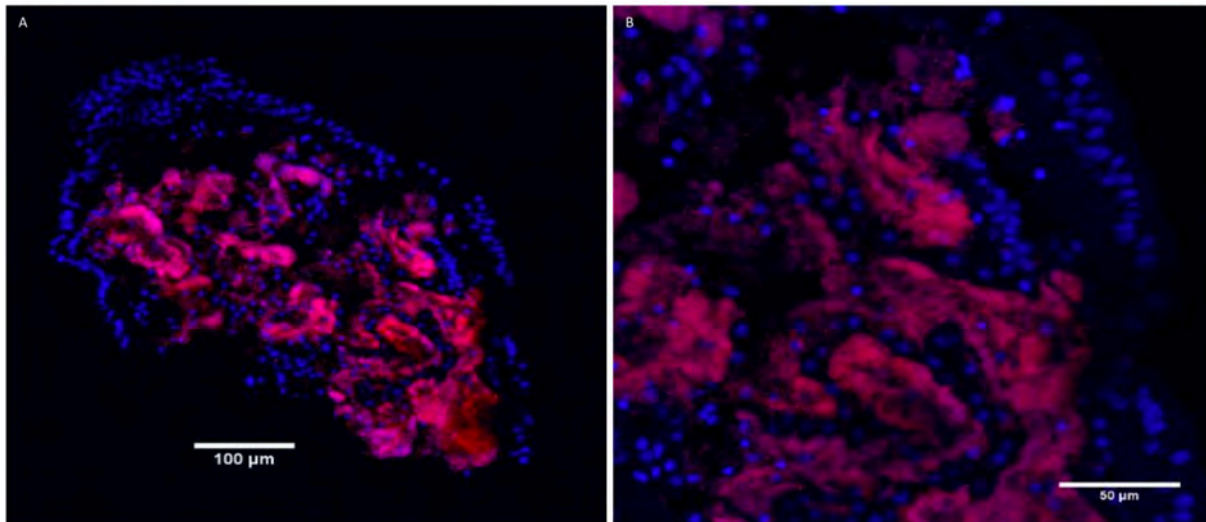


Fig 8. FISH image of pingo worm trophosome cross section. Fluorescence in situ hybridization of bacterial symbionts on a cross section of a pingo worm (sample 1078-13) : Epifluorescence images showing host nuclei, stained with DAPI (blue), and bacterial symbionts in red, hybridized with LaSp probes from Duperron et al., 2009. A: entire cross section at the level of the trophosome. B: close up of top right part of cross section shown in A. Note the high densities of bacterial symbionts.

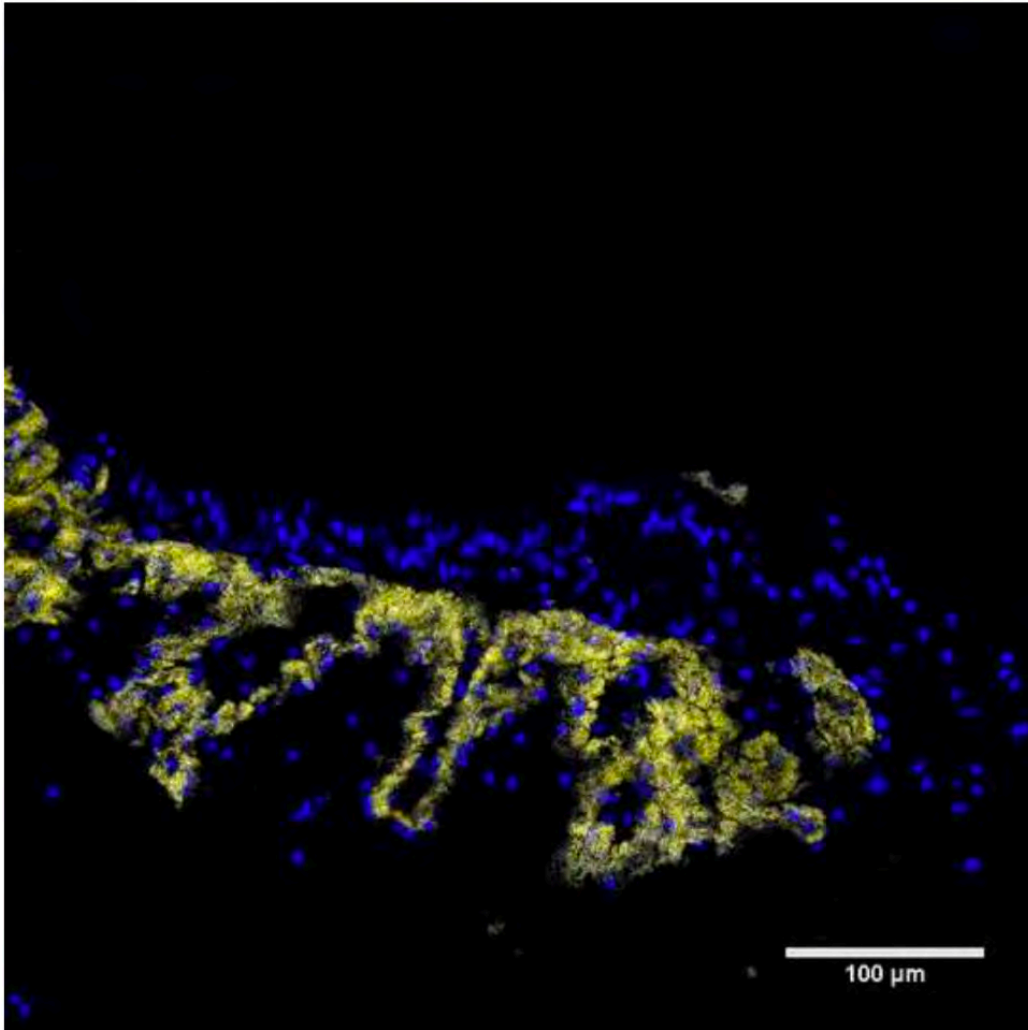


Fig 9. FISH image of crater worm longitudinal section. Epifluorescence image of a longitudinal section of the trophosome of a crater worm (sample 1125-6). Host nuclei appear blue due to DAPI staining. Bacterial cells (yellow) were hybridized with the GAM42 probe. From this point of view, the trophosome appears to contain multiple folds and the bacteria appear to follow these folds.

### **7.3 ARTICLE MASTER 2 : RELATIVE ABUNDANCES OF METHANE- AND SULFUR-OXIDIZING SYMBIANTS IN GILLS OF THE DEEP-SEA HYDROTHERMAL VENT MUSSEL *BATHYMODIOLUS AZORICUS* UNDER PRESSURE**

Un article regroupant les principaux résultats de mon stage de Master 2 sur « La variation des densités de bactéries endosymbiotiques chez la moule *Bathymodiolus azoricus* en réponse aux stress chimique et thermique» a été publié en 2015.



## Relative abundances of methane- and sulfur-oxidizing symbionts in gills of the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* under pressure

Kamil M. Szafranski<sup>a,b,\*</sup>, Bérénice Piquet<sup>a,b</sup>, Bruce Shillito<sup>a,b</sup>, François H. Lallier<sup>c,d</sup>, Sébastien Duperron<sup>a,b,e</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7208, Adaptation aux Milieux Extrêmes, Paris, France

<sup>b</sup> UMR, MNHN, UPMC, CNRS, IRD, UCBN 7208, Biologie des Organismes Aquatiques et Ecosystèmes, 75005 Paris, France

<sup>c</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7144, Equipe ABICE, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

<sup>e</sup> Institut Universitaire de France, Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 October 2014

Received in revised form

9 March 2015

Accepted 13 March 2015

Available online 23 March 2015

#### Keywords:

3D FISH

Hydrothermal vents

Pressurized recovery

Symbiosis

Symbiont quantification

Mussels

### ABSTRACT

The deep-sea mussel *Bathymodiolus azoricus* dominates hydrothermal vent fauna in the Azores region. The gills of this species house methane- and sulfur-oxidizing bacteria that fulfill most of the mussel's nutritional requirements. Previous studies suggested that the ratio between methane- and sulfur-oxidizers could vary in response to the availability of electron donors in their environment, and this flexibility is considered a key factor in explaining the ecological success of the species. However, previous studies were based on non-isobaric recovery of specimens, with experiments at atmospheric pressure which may have induced artifacts. This study investigates the effect of pressure-related stress during recovery and experimentation on the relative abundances of bacterial symbionts. Mussel specimens were recovered for the first time using the pressure-maintaining device PERISCOP. Specimens were subsequently transferred into pressurized vessels and exposed to various chemical conditions. Using optimized fluorescence in situ hybridization-based approaches, relative abundance of symbionts were measured. Our results show that the recovery method (isobaric versus non-isobaric) does not influence the abundances of bacterial symbionts. Significant differences occur among specimens sampled from two contrasting sites. Exposure of mussels from the deeper site to sulfide and bicarbonate, and to bicarbonate alone, both resulted in a rapid and significant increase in the relative abundance of sulfur-oxidizers. Results reported herein are congruent with those from previous reports investigating mussels originating from shallow sites and kept at ambient pressure. Isobaric recovery and maintenance allowed us to perform in vivo experiments in specimens from a deeper site that could not be maintained alive at ambient pressure, and will greatly improve the chances of identifying the molecular mechanisms underlying the dialogue between bathymodioline hosts and symbionts.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Bathymodiolinae mussels (family Mytilidae) are part of the remarkable fauna colonizing ecosystems such as hydrothermal vents and cold seeps in the deep-sea (Desbruyères et al., 2000; Duperron, 2010, 2009; von Cosel et al., 1999, 2001). These mussels rely upon sulfur- or methane-oxidizing (SOX and MOX) bacteria occurring in their gill epithelial cells for all or part of their

nutrition (Cavanaugh et al., 1981; Felbeck, 1981). The symbionts of mussels exploit compounds present in vent or seep fluids for their metabolism (Van Dover, 2000, 2002). Although sulfide is toxic to animals, symbiotic sulfur-oxidizers use hydrogen sulfide from the fluids as the source of energy for their metabolism and to fix inorganic carbon (Cavanaugh et al., 1988). Methane-oxidizing bacteria use methane both as a carbon and an energy source (Cavanaugh et al., 1992; Childress et al., 1986). Organic carbon compounds are subsequently transferred to their animal host and ultimately contribute to ecosystem productivity in habitats where only a small fraction of the photosynthetic primary production from upper layers of the oceans is brought in by sedimentation or advective transport (Cavanaugh, 1983; Corliss et al., 1979; Karl et al., 1980).

\* Corresponding author at: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7208, Adaptation aux Milieux Extrêmes, Paris, France. Tel.: +33 1 69 15 61 15.

E-mail address: [km.szafranski@gmail.com](mailto:km.szafranski@gmail.com) (K.M. Szafranski).

<sup>†</sup> Present address: Université Paris-Sud, Unité d'Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Orsay cedex 91405, France.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2015.03.003>

0967-0637/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Bathymodiolus azoricus* and its sister species *Bathymodiolus puteoserpentis* dominate several vent sites on the Mid-Atlantic Ridge (MAR). They possess both sulfur- and methane-oxidizing symbionts in their gill bacteriocytes, as demonstrated through ultrastructural studies, 16S rRNA-encoding gene sequence analyses, and enzyme assays (Cavanaugh et al., 1992; Distel et al., 1995; Duperron et al., 2006; Fiala-Medioni et al., 2002; Fisher et al., 1993). Dual symbiosis is thought to increase the environmental tolerance of hosts because the distinct metabolism of the sulfur- and methane-oxidizing symbionts may help the holobiont adapt to varying availability of reduced sulfur and methane (Distel et al., 1995; Fiala-Medioni et al., 2002). Several studies point to a high flexibility of the symbiont populations (Kádár et al., 2005; Riou et al., 2008). Bacteria indeed disappear from *B. azoricus* gill bacteriocytes when subjected to starvation in sulfide- and methane-free sea-water, but can be recovered when mussels return to sulfide-enriched aquaria (Kádár et al., 2005). The relative volume occupied by each symbiont type in bacteriocytes of *B. azoricus* varies within vent sites, and between sites displaying different chemical signatures (Halary et al., 2008). Experiments using mussels maintained in controlled conditions at atmospheric pressure with one, both or none of the electron donors necessary for endosymbiont metabolism confirm that symbiont relative abundances can change rapidly in response to changes in the availability of their respective substrates (Halary et al., 2008; Riou et al., 2010, 2008).

However, the previously mentioned results suffer numerous potential biases. First, specimen recovery from the MAR vent sites, which are located at depths between 800 m (Menez Gwen) and 3500 m (Logatchev), involved rapid (usually a few hours) and large de-pressurization of specimens (8 to 35 MPa). This results in high levels of stress, ultimately resulting in the death of specimens from the deepest sites (Halary et al., 2008). Second, specimens used in *in vivo* experiments are usually from shallower vent sites (Menez Gwen) and maintained in the laboratory at atmospheric pressure, *i.e.* ~80-fold lower than *in situ* conditions (Kádár et al., 2005; Riou et al., 2008). Results from these studies are thus potentially affected by artifacts associated with depressurization, and it remains to be confirmed whether observed symbiont dynamics were the consequence of these stresses or true biological responses. Another issue is with the quantification of symbionts itself. Several studies are based on a 3D fluorescence *in situ* hybridization (FISH) approach, which measures the fraction of the total volume occupied by each type of symbiont within bacteriocytes (Halary et al., 2008; Riou et al., 2008; Duperron et al., 2011). Although reliable, this approach is time consuming because it involves the acquisition of 3D images of gill sections, manual cropping of individual bacteriocytes, and computing volumes using a dedicated ImageJ plugin (Halary et al., 2008). This has limited the number of specimens that could be analyzed, reducing the statistical power of comparisons (Prosser, 2010).

Several pressurized vessels for live maintenance and pressurized recovery that prevent or reduce pressure-related stress have become available in recent years (Boutet et al., 2009). The first aim of the present study is to investigate relative symbiont abundances in *B. azoricus* mussels recovered from the Menez Gwen (800 m depth) and Rainbow (2300 m depth) vent sites using the pressure-maintaining PERISCOP sampling cell (Shillito et al., 2008). The second aim is to investigate these abundances in Rainbow specimens exposed to substrates used by the sulfide-oxidizing bacteria at their native pressure in the IPOCAMP vessel (Shillito et al., 2014). The percentage of total bacterial volume corresponding to methane- plus sulfur-oxidizing symbionts is measured by means of FISH and image analysis. In order to optimize the method, we compare results from three FISH-based approaches, and images acquired from the anterior and posterior regions of the gills. We then compare isobaric vs. non-isobaric recovery, Menez Gwen and Rainbow specimens, and the effect of treatments applied to live specimens from Rainbow. Results

are discussed in relation to improvements of the methods used to investigate symbiont dynamics in animal tissue in light of previous reports, based on specimens from non-isobaric recoveries and exposed to various experimental conditions at atmospheric pressure.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling sites

*B. azoricus* mussels (Bivalvia, Mytilidae) (Von Cosel et al., 2001) were collected from two hydrothermal vent sites during the 2013 BioBaz cruise to the Mid-Atlantic Ridge aboard RV *Pourquoi Pas?* using the ROV Victor 6000. Specimens were sampled from the vicinity of active smokers at Menez Gwen (MG2 marker, 37°50.669' N 31°31.156' W, 830 m depth) and Rainbow (France5 marker, 36°13.766' N 33°54.117' W, 2270 m depth) (Fig. 1). Active vents were colonized by fauna typical for MAR vents, including one bivalve (*B. azoricus*) and three shrimp species (*Rimicaris exoculata*, *Mirocaris fortunata* and *Chorocaris chacei*) (Desbruyères et al., 2001).

### 2.2. Isobaric and non-isobaric recovery

At each sampling site, specimens were recovered in clean watertight BioBoxes, which were brought to the surface by the ROV or the shuttle within a few hours (non-isobaric sampling). Others were placed inside a 'CROCO' sampling cell that was fit into the pressure-keeping vessel PERISCOP (isobaric recovery, Shillito et al., 2008). PERISCOP was then closed and the shuttle to which it was attached was released within a few minutes, and surfaced within 45 min. Pressure was monitored during surfacing with autonomous pressure sensor (SP2T4000, NKE Instruments, France). Once onboard, PERISCOP was opened and mussels were recovered and either dissected and fixed, or transferred to the IPOCAMP pressure vessel within 10 min.

### 2.3. Exposure to bicarbonate and sulfide in pressurized vessels

Six mussels from Rainbow, recovered using the PERISCOP, were taken out and used in incubation experiments (shell length: 44.4–100.5 mm). Due to the limited volume of the IPOCAMP chamber and the size of specimens, only two specimens were transferred in each of three 1 l Nalgene™ bottles filled with 11.8 μM NaHCO<sub>3</sub> and 36.4 μM Na<sub>2</sub>S; with 11.8 μM NaHCO<sub>3</sub>; or with filtered sea-water alone (control). These concentrations were within the range of values recorded in

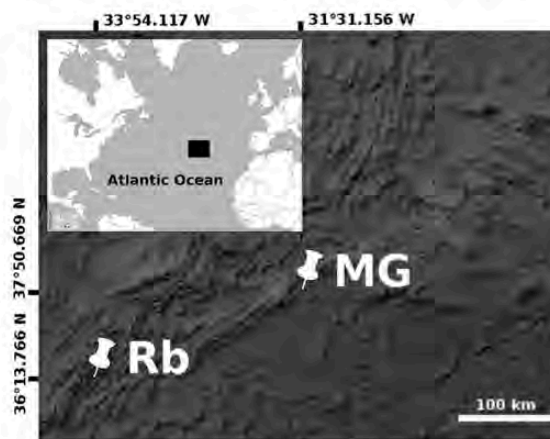


Fig. 1. Localization of sampling sites on the Mid-Atlantic Ridge. MG—Menez Gwen site (830 m depth); Rb—Rainbow site (2270 m depth).



mussel aggregates on the site, and similar to values used in previous studies (Halary et al., 2008; Riou et al., 2008). Bottles were tightly closed and re-pressurized in IPOCAMP aquariums within 5 min. Mussels were incubated at 23 MPa and 8 °C for 5 h, then dissected immediately and fixed.

#### 2.4. Sample fixation onboard

Anterior and posterior parts of mussel gill tissue were dissected at 4 °C and fixed for fluorescence in situ hybridization (FISH). Gill fragments were transferred to 4% formaldehyde in twice-filtered sea-water (TFSW) (4 °C, 2–4 h), rinsed, and dehydrated in increasing ethanol (50, 70, 80, and 96%, 15 min each). The density of gill filaments per millimeter was measured under a dissecting microscope.

#### 2.5. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Fragments of gills were embedded in polyethylene glycol distearate (PEG):1-hexadecanol (9:1), cut into 8 µm-thick sections and deposited on SuperFrost Plus slides (VWR International, USA). Wax was removed and tissue rehydrated in decreasing ethanol series (96% to 70%). Sections were hybridized using 40% formamide for 1–3 h at 46 °C as previously described (Duperron et al., 2008), rinsed, and mounted in DAPI-containing “Slow Fade” (Life Technologies) under a coverslip. Three 16S rRNA-specific probes were applied simultaneously on every section. FISH probes used are summarized in Table 1.

#### 2.6. Image acquisition and analysis

Slides were observed under a BX61 epifluorescence (Olympus, Japan) or a SP5 confocal (Leica, Germany) microscope, and images were acquired at 400x magnification using ImagePro 6.0 (Olympus,

Japan). On each section, a 2D image was first acquired by overlaying signals from the three probe-associated fluorochromes (2D acquisition). Second, an image stack was built by acquiring images every 0.3 µm over the thickness of the section (3D acquisition). Images were analyzed using ImageJ (Abramoff et al., 2004) and the total volume occupied by bacteria and respective proportions of the sulfur- and methane-oxidizing symbionts were computed for 2D and 3D images using the SymbiontJ plug-in as previously described, but applying the procedure to the whole field of view without isolating individual bacteriocytes (Halary et al., 2008). SymbiontJ applies filters and thresholds to the different color channels and computes the number of voxels corresponding to each symbiont type. Finally, ten bacteriocytes were manually cropped from each 3D acquisition, analyzed using SymbiontJ, and the mean percentage of volume occupied by each bacterial type was computed (bacteriocyte acquisition).

#### 2.7. Statistical analyses

The percentage of bacterial volume occupied by methane-oxidizing bacteria was used for all analyses, after an Arcsine transformation (Halary et al., 2008). Values were then used for transformation-based redundancy analyses (tb-RDA). Sampling site (Menez Gwen versus Rainbow), recovery mode (isobaric versus non-isobaric), acquisition method (2D, 3D or bacteriocyte), gill region (anterior versus posterior), and specimen were used as factors into the constrained redundancy analysis (RDA), in order to estimate their contribution to the global variance. Significance was assessed using permutation tests ( $n = 9999$ ) using a full model, with separate test for each term (factor). Shapiro–Wilk tests revealed non-normal distribution of the data, and non-parametric tests were thus applied for inter-groups comparisons. The Mann–Whitney–Wilcoxon (MWW, for 2 class factors) and Kruskal–Wallis (KW, for 3 or more class factors) tests were used to compare

**Table 1**  
Probes, target groups, and labels used in FISH experiments.

Probe	Target	Sequence [5' → 3']	Cy3	Cy5	FITC	Channel colour	Reference
EUB_338	Eubacteria	GCTGCTCCCGTAGGAGT	+	+	+	red	Amarin et al. (1990)
Imed_M-138	MOX	ACCATGTGTCCCCCACTAA	+	–	–	green	Duperron et al. (2008)
Bang_T-642	SOX	CCTATACTCTAGCTTGCCAG	–	+	–	blue	Duperron et al. (2005)
NON_338	negative control	ACTCTACGGGAGGCAGC	+	+	–	–	Wallner et al. (1993)

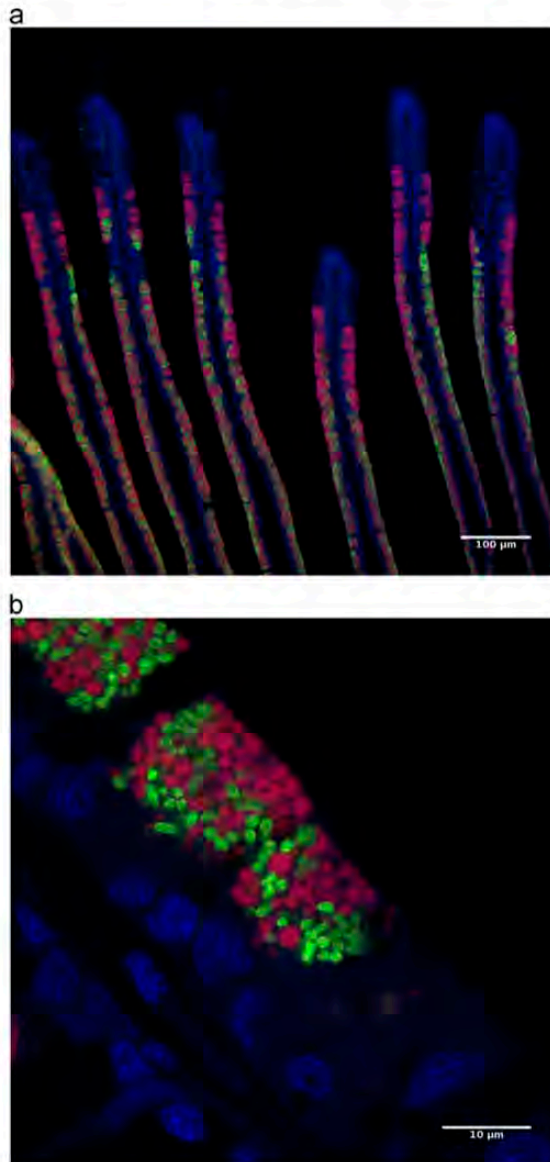
**Table 2**  
Sites, number of individuals, and percentages of methane- (MOX), and sulfur-oxidizers (SOX), standard deviation (SD) measured using the 2D, 3D, and bacteriocyte-based FISH methods in the anterior region of the gill. Maintained pressure during recovery has been calculated as follow:  $P_{\text{min}}/P_{\text{max}} \times 100\%$ , where  $P_{\text{max}}$  is the pressure at sampling site,  $P_{\text{min}}$ —the minimal pressure during recovery.

Site	Menez Gwen		Rainbow	
Point	MG2		France 5	
Depth	830 m		2270 m	
Position	37° 50.669' N 31° 31.156' W		36° 13.766' N 33° 54.117' W	
Recovery mode	BioBox		PERISCOPE	BioBox PERISCOPE
Maintained pressure	0%		83.60%	0% 76.50%
Number of individuals	7		10	3 16
Shell length mm (min–max)	32–47		26.3–39	88–97 67–88.5
2D FISH	% MOX	47.2	44.6	56.3 57.5
	% SOX	52.8	55.4	43.7 42.5
	S.D.	5.4	5.1	6.6 7.6
3D FISH	% MOX	46.5	44.3	56.3 56.3
	% SOX	53.5	55.7	43.7 43.7
	S.D.	5.8	5.7	6.4 8.3
10 bacteriocytes	% MOX	48.1	47.5	56.3 55.6
	% SOX	51.9	52.5	43.7 44.4
	S.D.	3.8	4.2	4.6 6.3

percentages of methanotrophs. All statistical analyses were performed using R (R Development Core Team, 2013); 'vegan' package was used for the constrained redundancy analysis.

### 3. Results

In order to optimize the 3D FISH method (Halary et al., 2008), three types of images were acquired and compared. For each mussel specimen, 10 acquisitions in 2D and 10 in 3D were obtained. From

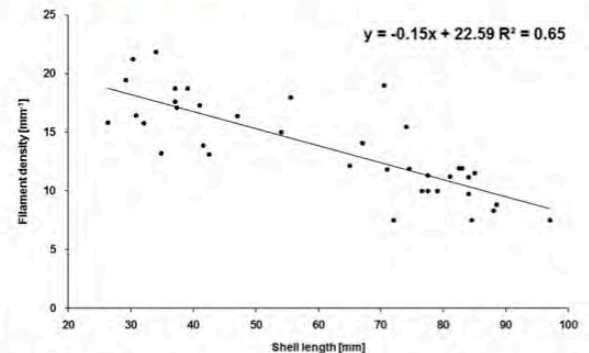


**Fig. 2.** Overview (A) and detail (B) of transverse sections through *B. azoricus* gill filaments observed at  $400\times$  magnification. Filaments were cut parallel to the plane defined by the animals anterior-posterior and left-right axes, and perpendicular to its dorso-ventral axis. Nuclei from host tissue are labeled with DAPI (blue). FISH-labeled bacterial symbionts appear in pink (sulfur-oxidizers) and green (methanotrophs). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

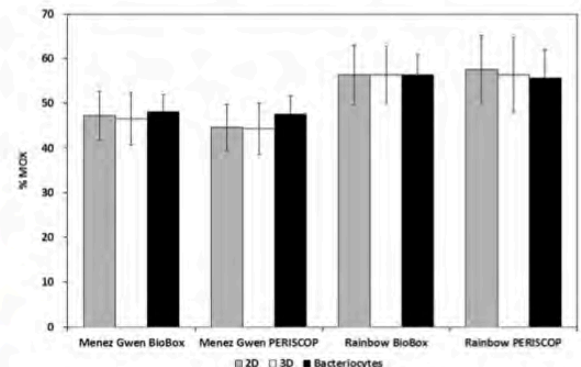
each of the later 3D acquisitions, 10 randomly chosen bacteriocytes were analyzed, resulting in 100 bacteriocytes per specimen. These acquisitions were obtained from at least 5 different sections, each containing 10–20 filaments. Results are summarized in Table 2, and a micrograph showing gill tissue with bacteriocytes containing the two symbionts is presented on Fig. 2. The analyses of 2D, 3D, and bacteriocytes did not yield significantly different results (KW test on all measurements including anterior and posterior gill regions,  $p$ -value=0.09).

The filament density per mm gill length along the anterior-posterior axis decreased significantly with increasing shell length ( $R^2=65\%$ , Pearson's correlation test:  $p$ -value < 0.001, Fig. 3). Gills form and grow from the posterior end. Percentages of methanotrophs (MOX) in the anterior and posterior regions of gill from 3 specimens per treatment (12 specimens) were computed using 2D and 3D methods, yielding in total 480 measurements (Table 2, Table S1). The percentage of volume occupied by methanotrophs was not significantly different between anterior and posterior regions of the gills (MWW test,  $p$ -value=0.64). Subsequent analyses were thus made only on the anterior part of gills, for which more specimens were available.

When recovered in BioBoxes, mussels from Menez Gwen and Rainbow experienced pressure loss of around 8.3 and 23 MPa, respectively. The use of PERISCOP prevented that, and mussels arrived onboard at pressures close to those of the deep waters (Table 2). Percentages of volume occupied by methanotrophs were  $46.5\% \pm 5.8$  and  $56.3\% \pm 6.4$  in Menez Gwen and Rainbow mussels recovered in BioBoxes, and  $44.3\% \pm 5.7$  and  $56.3\% \pm 8.3$  in mussels recovered using PERISCOP (Fig. 4, Table 2). A MWW test based on 1140 values from the



**Fig. 3.** Density of gill filaments versus antero-posterior length of the shell. Fitted line is a linear regression ( $R^2=65\%$ , Pearson's correlation test:  $p$ -value < 0.001).



**Fig. 4.** Mean percentage and standard deviation of total bacterial volume occupied by methane-oxidizers in gill tissue of *B. azoricus* specimens from Menez Gwen and Rainbow recovered in BioBoxes (non-isobaric) and PERISCOP vessels (isobaric). Shades of grey correspond to the three FISH methods as indicated (see text for details).

anterior and posterior regions of the gills indicated no significant difference between the two types of recovery ( $p$ -value=0.12).

Mussels from Menez Gwen and Rainbow sites displayed significantly different percentages of methanotrophs in their gills (MWW test,  $W=36185.5$ ,  $p$ -value  $< 2.2e-16$ ). A unilateral test confirmed that methanotrophs occupied a higher fraction of the overall volume in bacteriocytes of *B. azoricus* from the deeper Rainbow site (Fig. 4, Table 2, Table S1).

The influence of each aforementioned factor was estimated by constrained redundancy analysis (RDA) and ANOVA permutation tests. Overall, our model could explain 56% of the total variance. Sampling site was the most influential factor (41%;  $df=1$ ;  $F=1026.1$ ), followed by inter-individual differences, which accounted for more than 14% ( $df=27$ ;  $F=13.3$ ) of the total variance. Other factors explained much lower fractions of the variance: recovery mode (0.3%;  $df=1$ ;  $F=7.7$ ), acquisition method (0.3%;  $df=2$ ;  $F=3.8$ ) and gill region (0.04%;  $df=1$ ;  $F=0.1$ ) (Table S2).

Each experimental condition could be applied to 2 specimens only from Rainbow because of the limited volume of bottles and the limited number of bottles that could be incubated at once in pressurized vessels. Nevertheless, 2 different treatments ( $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{S}$  or  $\text{NaHCO}_3$  alone) and 2 control experiments (10 mussels fixed immediately after recovery using PERISCOPE and 2 incubated in filtered seawater in the same conditions as above) were applied, and 320 measurements were made using 2D and 3D methodologies (Fig. 5, Table S3). There was no significant difference between 2D and 3D FISH acquisition methods in this dataset (MWW test,  $p$ -value=0.54). The different treatments under pressure resulted in significant differences in percentages of methanotrophs (KW test,  $p$ -values  $< 0.011$ ). The percentage of sulfur-oxidizers was twice higher in specimens exposed to sulfide and bicarbonate than in the sea-water treatment, with  $90.1 \pm 17.6$  versus  $38.5 \pm 4.9$  (Fig. 5, Table S3). Specimens exposed to bicarbonate alone also displayed a markedly higher percentage of sulfur-oxidizers (SOX) than in the sea-water treatment. SOX in the bicarbonate treatment occupied  $76.0 \pm 23.0$  of the bacterial volume. The percentage of SOX was slightly lower in mussels incubated in filtered seawater than prior to treatments ( $38.5 \pm 4.9$  versus  $42.5 \pm 7.6$ ). Constrained RDA indicated that the overall variance was mainly explained by the 'treatment' factor (68.5%;  $df=3$ ;  $F=506.7$ ) and by inter-individual variability (18%;  $df=12$ ;  $F=32.8$ ), while 0.4% ( $df=1$ ;  $F=0.9$ ) was due to the method of image acquisition (Table S4).

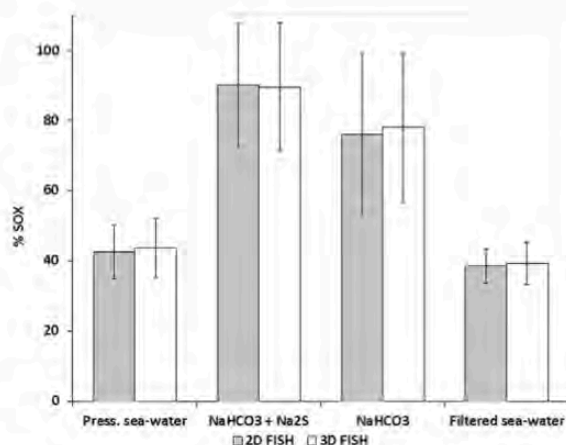


Fig. 5. Mean percentage and standard deviation of total bacterial volume occupied by sulfur-oxidizers in gill tissue of *B. azoricus* specimens from Rainbow upon recovery using PERISCOPE (TO) and exposed to experimental treatments in pressurized vessels ( $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , filtered sea-water). Shades of grey correspond to the two FISH methods as indicated (see text for details).

## 4. Discussion

### 4.1. Image based quantification of volumes occupied by symbionts

Three FISH approaches were applied in this study, based on acquisition of 2D (Fig. 2A) and 3D images, and of individual bacteriocytes (Fig. 2B). They did not yield significantly different results. Although the results are similar, the bacteriocyte-based method used in previous studies (Riou et al., 2010) is by far the most time-consuming, because it involves manually cropping and computing percentages of methanotrophs in at least 10 bacteriocytes from each 3D image. If the aim is to maximize the number of acquisitions, the 2D or 3D approaches are equally suitable and far less time-consuming. In this study we managed to analyze a total of 36 specimens with two to three of these methods (Table 2), while previous studies using 3D FISH were based 20 or fewer individuals (Duperron et al., 2011, 2007; Halary et al., 2008; Lorion et al., 2012; Riou et al., 2010, 2008).

### 4.2. Sampling methodology

The density of gill filaments was negatively related to shell length, i.e. the longer the shell was, the less dense gill filaments were (Fig. 3). Similar filament densities and size-related trend are reported for the mussel *Mytilus edulis* (Jones et al., 1992). The gill forms and grows from the posterior end in bivalves (Cannuel et al., 2009; Wentrup et al., 2014); this process could result in differences in symbiont relative abundances between the 'young' posterior part and 'old' anterior one, but this was not confirmed by our data. It is likely that the absolute number of symbionts in each filament, which was not computed here, is different in the respective gill regions, in particular in the posterior-most budding zone (Wentrup et al., 2014). Measuring absolute numbers of symbionts would be necessary, but a reliable method still remains to be implemented (Boutet et al., 2011).

The two sites analyzed differed in depth (850 m at Menez Gwen and 2300 m at Rainbow) but non-isobaric recovery in BioBoxes involved significant pressure loss and potential physiological stress in both cases. Recovery stress is a major criticism often addressed to deep-sea biologists and physiologists by many colleagues who are dubious about reports from *ex situ* experiments. In the present study, mussels were for the first time recovered under their natural pressure until opening of the PERISCOPE vessel on board, and compared with specimens recovered using classical, non-isobaric BioBoxes. Results indicate that, as far as symbiont relative abundances in gills are concerned, the recovery mode did not have any significant influence, not even for the deeper Rainbow site (Fig. 4). This major finding validates *a posteriori* previous studies dealing with symbiont relative abundances that did use classical non-isobaric recovery methods involving pressure loss (Duperron et al., 2011, 2006; Halary et al., 2008; Lorion et al., 2012; Riou et al., 2010, 2008). However, although non-isobaric sampling is appropriate for studies focusing on symbiont relative abundances, isobaric recovery probably makes a difference when dealing with physiological parameters such as host and symbiont activities and gene expression. FISH signal intensities (but not areas and volumes) were indeed usually higher in specimens recovered using PERISCOPE, suggesting that ribosomes to which FISH probes attach were less abundant in the latter (unpublished data).

### 4.3. Site-related differences in symbiont abundances

Besides depth, the Menez Gwen and Rainbow sites differ by several characteristics, including the chemical composition of end-member fluids. Fluids at Menez Gwen indeed display slightly lower concentrations of methane compared to Rainbow (Charfou et al., 2002). Sulfide concentrations are similar, but sulfide interacts with the high concentrations of iron at Rainbow, and is thus not readily

available to organisms (Desbruyères et al., 2000; Le Bris and Duperron, 2010). Geochemical modeling applied to the mixing zone where mussels actually live indicate that more energy can be gained from sulfide at Menez Gwen compared to methane, while the opposite situation is encountered at Rainbow (Le Bris and Duperron, 2010). The result at Rainbow is however less clear-cut when including hydrogen, an alternative energy source for sulfur-oxidizing symbionts (Petersen et al., 2011). The ratio between sulfide and methane has been shown to influence the relative abundance of sulfur- versus methane-oxidizers in mussel gills, and methanotrophs are more abundant than thiotrophs at Rainbow (Duperron et al., 2006). Previous estimations of symbiont relative abundances indicated that sulfur-oxidizers represented  $53.1\% \pm 10.3$  of the total volume of symbionts at Menez Gwen, compared to 39.4% at Rainbow (Halary et al., 2008; Le Bris and Duperron, 2010). Our results from PERISCOP-recovered specimens were remarkably close ( $52.6\% \pm 4.9$  and  $43.7\% \pm 6.4$ , respectively; Table 2). This is in line with the hypothesis that symbiont relative abundances depend on the availability of their respective substrates (Fiala-Medioni et al., 2002; Riou et al., 2008; Trask and Van Dover, 1999). Furthermore, the unexpected similarity between measurements made on specimens sampled in 2006 and 2013 suggests a certain level of long term stability in site-related differences, although short-term fluctuations certainly have occurred (Duperron et al., 2006; Halary et al., 2008).

#### 4.4. Symbiont response to bicarbonate and sulfide pulses under pressure

Starvation experiments and exposure to increased concentrations of different chemosynthesis substrates have already been performed by several groups (Halary et al., 2008; Kádár et al., 2005; Riou et al., 2008), but most often on *B. azoricus* from the shallower Menez Gwen site and at ambient pressure. Here, we tested the effect of sulfide and bicarbonate exposure on pressurized *B. azoricus* from the deeper Rainbow site (2300 m depth). Mussels from this site are not easily maintained in the lab at ambient pressure (authors' personal observation). PERISCOP-recovered mussels were transferred to pressure vessels and maintained at 8 °C and 23 MPa. A 5 h incubation period with bicarbonate and sulfide resulted in doubling of the relative abundance of thiotrophs in the gills (Fig. 5). Exposure to bicarbonate alone also significantly increased the relative abundance of thiotrophs (Fig. 5). These rapid changes confirm that observations reported in Halary et al., 2008 and other works on mussels from Menez Gwen were not artifacts, and not linked to recovery stress or experimentation at atmospheric pressure. The increase in thiotroph relative volume observed in the present study is even more spectacular (65.0% in Halary et al., 2008). In another study, mussels subjected to a one-month starvation followed by 4 days of constant sulfide supply showed a 96% bacterial volume occupation by thiotrophs (Riou et al., 2008). Here, we show that non-starved *B. azoricus* can shift to an almost thiotrophic symbiosis within 5 h of exposure to sulfide and bicarbonate (Fig. 5). Unfortunately, only two specimens could be subjected to each treatment because of space limitations in IPOCAMP. So although the trend is clear, data from more specimens is needed to reliably estimate the true amplitude of this effect. Thiotrophic symbionts fix inorganic carbon using ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Oxygenase (RubisCO) in the Calvin cycle (Cavanaugh et al., 1988). This process requires energy from the oxidation of reduced sulfur compounds (Cavanaugh et al., 1988). The less spectacular increase in relative abundance of thiotrophs when only bicarbonate was available also suggests that another source of energy may have been used for chemosynthesis. Over a short period, bacteria might have used sulfur stored in compounds such as taurine or thiotaurine (Pruski and Fiala-Médioni, 2003). Alternatively, hydrogen, not measured in our study, has been demonstrated to be an alternative energy source for hydrothermal vent symbioses (Amend and Shock, 2001;

Petersen et al., 2011). Although the increase in thiotrophs relative abundance could result directly from an actual increase in their number, it could alternatively result from a decrease in methanotrophs, whose substrate was absent and which may have been digested by host bacteriocytes before thiotrophs. Methanotrophs are indeed located more basally within bacteriocytes, closer to phagolysosome-like bodies (Distel et al., 1995; Duperron et al., 2005). It is not known which mechanisms on the host and symbionts sides control the dynamics of bacterial populations within bacteriocytes. Mussel symbionts have been shown to divide and to be digested within bacteriocytes, but additional mechanisms may explain their variations, including symbiont uptake from the environment by adults, as suggested in *B. brevis*, and symbiont release as documented in corals (Dubilier et al., 1998; Lesser, 2011; Thurber et al., 2009). Whatever the underlying mechanisms, the symbiont population as a whole seems to be rapidly and significantly affected by changes in the availability of energy and carbon sources, although results from more specimens are necessary.

## 5. Conclusions

In this study, a FISH-based method was used to quantify relative abundances of endosymbionts in gills of *B. azoricus*. Abundances in the anterior and posterior regions of the gill were similar. Mussels sampled in isobaric and non-isobaric recovery devices displayed similar relative volumes of the two types of symbionts indicating that non-isobaric recovery does not induce a major bias in measured volume occupation. However, the physiological status of mussels and their endosymbionts is probably not the same and isobaric recovery is certainly to be recommended for physiological or expression studies of specimens from the deepest sites. Symbiont relative volumes were different between the Menez Gwen and Rainbow sites, and similar to those previously measured on specimens sampled 7 years ago. On the other hand, symbiont populations displayed high flexibility in exposure experiments performed in pressurized aquaria. As postulated previously, this flexibility is certainly an advantage because physico-chemical micro-environments at hydrothermal vents are highly variable in time and space (Chevaldonné et al., 1991; Johnson et al., 1994, 1986; Le Bris et al., 2005), and maybe the key for the domination of *B. azoricus* at various hydrothermal vent sites of the Mid-Atlantic Ridge (Desbruyères et al., 2001, 2000; Von Cosel et al., 1999). More experiments involving methane, hydrogen, toxic compounds, but also thermal stress and symbiont release experiments will be necessary to further explore this flexibility. The next step will then be to unravel the mechanisms that control this flexibility by exploring cell division patterns, genes and protein expressions of host and symbionts in various conditions.

## Acknowledgments

We thank the captain and crew of RV "Pourquoi Pas?" and ROV "Victor 6000" for their invaluable help onboard. We are grateful to M. Zbinden, J-Y. Collet, J-B. Collet and A. Tanguy for their help with samples and aquaria onboard, and V. Le Layec for his help in the lab. This research was supported by CNRS, UPMC, UCBN and ITN Symbiomics. K. Szafranski was funded through a Ph.D. grant from the Marie Curie Actions Initial Training Network (ITN) SYMBIOMICS (contract number 264774). The authors would like to thank the reviewers and editors for their comments that helped to improve the manuscript.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2015.03.003>.

## References

- Abramoff, M., Magelhaes, P., Ram, S., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11, 36–42.
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919–1925.
- Amend, J.P., Shock, E.L., 2001. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 175–243.
- Boutet, I., Jollivet, D., Shillito, B., Moraga, D., Tanguy, A., 2009. Molecular identification of differentially regulated genes in the hydrothermal-vent species *Bathymodiolus thermophilus* and *Paralvinella pandorae* in response to temperature. *BMC Genomics* 10, 222.
- Boutet, I., Ripp, R., Lecompte, O., Dossat, C., Corre, E., Tanguy, A., Lallier, F.H., 2011. Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* 12, 530.
- Cannuel, R., Beninger, P.G., 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, C.M., 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature* 302, 58–61.
- Cavanaugh, C.M., Abbott, M.S., Veenhuis, M., 1988. Immunohistochemical 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., Gardiner, S.L., Jones, M.L., Jannasch, H.W., Waterbury, J.B., 1981. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213, 340–342.
- Cavanaugh, C.M., Wirsen, C.O., Jannasch, H.W., 1992. Evidence for methylothrophic symbionts in a hydrothermal vent mussel (bivalvia: mytilidae) from the mid-atlantic ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3799–3803.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P., Holm, N., 2002. Geochemistry of high H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14′N, MAR). *Chem. Geol.* 191, 345–359.
- Chevaldonné, P., Desbruyères, D., Haïre, M.L., 1991. Time-series of temperature from three deep-sea hydrothermal vent sites. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 38, 1417–1430.
- Childress, J.J., Fisher, C.R., Brooks, J.M., Kennicutt, M.C., Bidigare, R., Anderson, A.E., 1986. A methanotrophic marine molluscan (bivalvia, mytilidae) symbiosis: mussels fueled by gas. *Science* 233, 1306–1308.
- Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.L., Edmond, J.M., Herzen, R.P. von, Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K., Andel, T.H. van, 1979. Submarine thermal springs on the Galápagos Rift. *Science* 203, 1073–1083.
- Desbruyères, D., Almeida, A., Biscoito, M., Comtet, T., Khrifounoff, A., Bris, N.L., Sarradin, P.M., 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.
- Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J.-C., Colaço, A., Comtet, T., Crassous, P., Fouquet, Y., Khrifounoff, A., Le Bris, N., Olu, K., Riso, R., Sarradin, P.-M., Segonzac, M., Vangriesheim, A., 2001. Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep-Sea Res.* 148, 1325–1346.
- Distel, D.L., Lee, H.K., 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.
- Dubilier, N., Windoffer, R., Giere, O., 1998. Ultrastructure and stable carbon isotope composition of the hydrothermal vent mussels *Bathymodiolus brevior* and *B. sp. affinis* brevior from the North Fiji Basin, western Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 165, 187–193.
- Duperron, S., 2010. The diversity of deep-sea mussels and their bacterial symbioses. In: Kiel, S. (Ed.), *The Vent and Seep Biota, Topics in Geobiology*. Springer, Netherlands, pp. 137–167.
- Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, A., Pemthaler, A., McKiness, Z.P., DeChaïne, E., Cavanaugh, C.M., 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., Guezzi, H., Gaudron, S.M., 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., Laurent, M.C.Z., Gaill, F., Gros, O., 2008. Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of Mytilidae associated with wood falls. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 338–349.
- Duperron, S., Lorion, J., Samadi, S., Gros, O., Gaill, F., 2009. Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *C. R. Biol.* 332, 298–310.
- Duperron, S., Nadaïg, T., Caprais, J.C., 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., Sibuet, M., MacGregor, B.J., Kuypers, M.M.M., Fisher, C.R., 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.
- Felbeck, H., 1981. Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213, 336–338.
- Fiala-Medioni, A., McKiness, Z.P., Dando, P., Boulegue, J., Mariotti, A., Alayse-Danet, A.M., Robinson, J.J., 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.
- Fisher, C.R., Brooks, J.M., Vodenichar, J.S., Zande, J.M., Childress Jr., J.J., 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.
- 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, K.S., Beehler, C.L., Sakamoto, C.M., Childress, J.J., 1986. In situ measurements of chemical distributions in a deep-sea hydrothermal vent field. *Science* 231, 1139–1141.
- Johnson, K.S., Childress, J.J., Beehler, C.L., Sakamoto, C.M., 1994. Biogeochemistry of hydrothermal vent mussel communities: the deep-sea analogue to the intertidal zone. *Deep Sea Res.* 141, 993–1011.
- Jones, H.D., Richards, O.G., Southern, T.A., 1992. Gill dimensions, water pumping rate and body size in the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 155, 213–237.
- Kádár, E., Bettencourt, R., Costa, V., Santos, R.S., 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, D.M., Wirsen, C.O., Jannasch, H.W., 1980. Deep-sea primary production at the Galapagos hydrothermal vents. *Science* 207, 1345–1347.
- Le Bris, N., Duperron, S., 2010. Chemosynthetic communities and biogeochemical energy pathways along the Mid-Atlantic Ridge: the case of *Bathymodiolus azoricus*. In: Rona, P.A., Devey, C.W., Dymet, J., Murton, B.J. (Eds.), *Diversity of Hydrothermal Systems on Slow Spreading Ocean Ridges*. 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.* 152, 1071–1083.
- Lesser, M.P., 2011. Coral bleaching: causes and mechanisms. In: Dubinsky, Z., Stambler, N. (Eds.), *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer, Netherlands, pp. 405–419.
- Lorion, J., Halary, S., Nascimento, J., do, Samadi, S., Colouaux, 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, 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., Dubilier, N., 2011. Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* 476, 176–180.
- Prosser, J.I., 2010. Replicate or lie. *Environ. Microbiol.* 12, 1806–1810.
- Pruski, A.M., Fiala-Medioni, A., 2003. Stimulatory effect of sulphide on thioaurine synthesis in three hydrothermal-vent species from the East Pacific Rise. *J. Exp. Biol.* 206, 2923–2930.
- 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 (<http://www.R-project.org/>), URL
- Riou, V., Duperron, S., Halary, S., Dehairs, F., Bouillon, S., Martins, I., Colaço, A., 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., Elsken, M., Bettencourt, R., Santos, R.S., Dehairs, F., Colaço, A., 2008. Influence of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>S availability on symbiont distribution, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeochemistry* 5, 1681–1691.
- Shillito, B., Gaill, F., Ravaux, J., 2014. The Ipcamp pressure incubator for deep-sea fauna. *J. Mar. Sci. Technol. -Taiwan* 22, 97–102.
- Shillito, B., Hamel, G., Duchi, C., Cottin, D., Sarradin, J., Sarradin, P.-M., Ravaux, J., Gaill, F., 2008. Live capture of megafauna from 2300 m depth, using a newly designed pressurized recovery device. *Deep Sea Res.* 155, 881–889.
- Thurber, R.V., Willner-Hall, D., Rodriguez-Mueller, B., Desnues, C., Edwards, R.A., Angly, F., Dinsdale, E., Kelly, L., Rohrer, F., 2009. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ. Microbiol.* 11, 2148–2163.
- Trask, J.L., Van Dover, C.L., 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.
- Van Dover, C., 2000. *The Ecology of Deep-sea Hydrothermal Vents*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Van Dover, C.L., German, C.R., Speer, K.G., Parson, L.M., Vrijenhoek, R.C., 2002. Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. *Science* 295, 1253–1257.
- Von Cosel, R., Cosel, R.V., Comtet, T., 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.
- Von Cosel, R., Salas, C., Hoiseter, T., 2001. Vesicomidae (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., Schimak, M., Borowski, C., Dubilier, N., 2014. Forever competent: deep-sea bivalves are colonized by their chemosynthetic symbionts throughout their lifetime. *Environ. Microbiol.* 16, 3699–3713.

## 7.4 COMMUNICATIONS EFFECTUEE DURANT LA THESE

### 7.4.1 Posters :

- 1) **Piquet B.**, Quiles A., Shillito B., Andersen A.C. and Duperron S., Flexibility of the symbiosis between *Bathymodiolus* (Bivalvia : Mytilidae) and chemosynthetic bacteria,
  - **Journée des Jeunes Chercheurs 2015**, December 3rd 2015, Station Biologique de Roscoff
  - **Réunion annuelle 2016 du Réseau Ecologie des Interactions Durables**, 29 to 31 March 2016, Poitiers
  - **Colloque National sur la Biologie et l'Ecologie des Ecosystèmes à base de Chimiosynthèse 2**, 9 to 11 May 2016, Brest
- 2) **Piquet B.**, Shillito B., Duperron S and Andersen A.C., Does apoptosis play a role in the host-symbionts regulation in the mussel *Bathymodiolus*?
  - **International Conference on Holobionts**, April 19-21, 2017, Paris
- 3) **Piquet B.**, Shillito B., Zbinden M., Tanguy A., Lallier F., Andersen A. C. and Duperron S, Apoptosis in the tissues of *Bathymodiolus* mussels under bathymetric pressurized/ versus unpressurized conditions: the possible role of apoptosis in regulating the branchial microbiota.
  - **International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems**, August 27 to September 1 2017, Woods Hole Mass. USA

### 7.4.2 Oraux :

- 1) **Piquet B.**, Szafranski K., Quiles A., Shillito B., Andersen A.C. and Duperron S., Relative abundances of methane -and sulfur -oxidizing in gills of two mussels from deep -sea hydrothermal vents maintained under pressure.
  - **MIDAS Final Meeting**, Gent Belgium, 3-7 october 2016
- 2) **Piquet B.**, Shillito B., Duperron S and Andersen A.C., Does apoptosis play a role in the host-symbionts regulation in the mussel *Bathymodiolus*?
  - **Réunion annuelle 2017 du Réseau Ecologie des Interactions Durables**, 22 to 24 March 2016, Toulouse
- 3) Flash talk : **Piquet B.**, Shillito B., Zbinden M., Tanguy A., Lallier F., Andersen A. C. and Duperron S, Apoptosis in the tissues of *Bathymodiolus* mussels under bathymetric pressurized/ versus unpressurized conditions: the possible role of apoptosis in regulating the branchial microbiota.
  - **International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems**, August 27 to September 1 2017, Woods Hole Mass. USA
- 4) **Invitation de Colleen Cavanaugh** dans son équipe Department of Organismic and Evolutionary Biology, Havard University, Cambridge, USA, September 5 2017
- 5) **Piquet B.**, Shillito B., Duperron S and Andersen A.C., Does apoptosis and cell growth play a role in the host symbionts regulation in the mussel *Bathymodiolus*?

- **International Symbiosis Society Congress**, July 15-20 2018, Oregon State University, USA.

## 7.5 ENCADREMENT DE STAGES

- **Stage de 8 semaines : Myriam Lebon** Licence 2 (co-encadrement avec Sébastien Duperron)
  - Etude immuno-histologique de l'apoptose et de la multiplication cellulaire dans les branchies de *Bathymodiolus boomerang*
- **Stage de 8 semaines : Antoine Mangin** Licence 3 pro (co-encadrement avec Sébastien Duperron)
  - Localisation et quantification de l'apoptose dans les branchies d'une moule côtières *Mytilus edulis*
- **Stage de 8 semaines : Coralie André** Master (co-encadrement avec Ann Andersen)
  - La multiplication cellulaire dans la branchie d'une moule *Mytilus edulis* ; comparaison entre deux techniques de marquages : BrdU et Edu.

## 7.6 FORMATION DOCTORALE

### 7.6.1 Module insertion professionnelle

- Initiation aux pratiques de médiation scientifiques comprenant 1 module théorique « Introduction à la médiation scientifique : enjeux, méthodes et préparation d'activités pratiques » (8h) et un module pratique « animatrice scientifique dans le cadre d'un festival de sciences de l'association Paris-Montagne » (4 jours)
- Weekend d'intégration 2016 de l'Ecole doctorale 227

### 7.6.2 Modules techniques et d'ouvertures

- Microbiodiversité : entre écosystèmes, évolution et société (15h)
- R (30h)

## 8 TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1 : Photo des 6 exemples de symbioses décrits dans l'introduction. A) Microbiote intestinal humain (© INSERM). B) La sépiole <i>Euprymna scolopes</i> (© McFall-Ngai Lab). C) Le bivalve <i>Codakia orbiculata</i> (Thèse Nathalie Elisabeth, 2011). D) Le charançon du blé (Vigneron <i>et al.</i> , 2014). E) Le vestimentifère <i>Riftia pachyptila</i> (© IFREMER). F) Corail du genre <i>Isopora</i> ayant perdu une partie de ses symbiotes, sur le côté droit de la photo (© IRD) .....	17
Figure 2 : les différentes voies de transmission des symbiotes: a) transmission environnementale ou horizontale. b) transmission verticale ou parentale. c) transmission verticale avec possibilité d'acquisition depuis un autre organisme (Bright and Bulgheresi, 2010). .....	18

Figure 3 : Diagramme circulaire montrant les valeurs médianes des genres bactériens présent à plus de 3% dans les échantillons fécaux d'enfants du Burkina Faso (BF) et Européens (EU) (De Filippo <i>et al.</i> , 2010).	23
Figure 4: Ultrastructure des branchies de <i>Codakia orbicularis</i> durant un jeûne. A) Des filaments de branchies venant d'être récoltés. B) Après 4 mois de jeûne, les bactériocytes sont remplacés par des cellules à grains. (CZ) zone ciliée, (LZ) zone latérale, (NCI) cellule intercalaire non ciliée, (BC) bactériocytes, (GC) cellules à grains (Caro <i>et al.</i> , 2007).	24
Figure 5 : Devenir des symbiotes de <i>Riftia pachyptila</i> . Chez les spécimens tout juste récoltés, l'hôte et les symbiotes sont vivants. Les cellules hôtes de la zone centrale se multiplient alors que les cellules de la zone périphérique meurent par apoptose et les symbiotes sont digérés. A la mort de l'hôte, la digestion cesse et les symbiotes peuvent être relargués (Klose <i>et al.</i> , 2016).	26
Figure 6 : A) Schéma d'un lobule de trophosome. B) Schéma du cycle des bactériocytes. Av = Vaisseau sanguin axial, zone c = centrale, m = médiane, p = périphérique, d = bactériocyte dégradé, pv= péritoine basal au vaisseau sanguin périphérique (Bright and Lallier, 2010).	27
Figure 7 : Photo d'une zone ciliée d'une branchie de <i>Codakia orbicularis</i> montrant en vert un marquage de la phospho-histone H3. En bleu, le signal DAPI. La flèche montre le marquage d'un noyau d'une cellule ciliée en cours de mitose, et l'étoile, un hémocyte marqué. tb (tissu bride) = pont tissulaire. Barre d'échelle : 20µm (Caro <i>et al.</i> , 2009).	28
Figure 8 : Photo au microscope à épifluorescence de coupe du ver <i>Riftia pachyptila</i> qui a incorporé du BrdU. A et B) Noyaux marqués au BrdU dans la région des bactériocytes après une incubation au BrdU de 30min (flèches). C) Noyaux marqués au BrdU dans la région des bactériocytes après une incubation de 3h. D) Noyaux marqués au BrdU dans le trophosome dans la région médiane et périphérique. Barre d'échelle : A) 50µm B) 10µm C) 100µm et D) 10µm (Pflugfelder <i>et al.</i> , 2009).	29
Figure 9 : Schéma représentant le cycle cellulaire (dessin B. Piquet). Les lignes indiquent les moments où le processus de multiplication cellulaire est détectable. La ligne verte : La phospho-Histone H3, La ligne bleue : la microscopie électronique à transmission et la ligne rouge : le BrdU et l'EdU.	30
Figure 10 : Distribution de la phospho-histone H3 à différentes étapes de la mitose cellule MCF-7 (lignée de cellule tumorale). A) : fin de prophase. B) : métaphase. C) : anaphase. D) et E) : télophase. F) et G) fin de mitose. PI : ADN marqué avec du PI (rouge), FITC : anticorps anti-phospho-histone H3 couplé au fluorochrome FITC (vert) et Merge : superposition des signaux PI et FITC (Li <i>et al.</i> , 2005).	31
Figure 11 : Division d'un symbiote <i>Gammaproteobacteria</i> du nématode marin <i>Euboastrichus dianaeae</i> . En rouge l'ADN et en vert l'anneau FtsZ qui sépare les deux bactéries (Pende <i>et al.</i> , 2014).	32
Figure 12 : Cinq types différents de mécanismes cellulaires de la perte de symbiote dans le tissu des Coraux. De haut en bas : cellule normale, digestion du symbiote <i>in situ</i> , expulsion du symbiote par	



exocytose, détachement de la cellule accueillant les symbiotes, apoptose de la cellule et en dernier nécrose de la cellule. H : cellule de l'Hôte, Sy : Symbiote, M : Mésoglée (Weiss, 2008).....	34
Figure 13 : Autophagie et apoptose des cellules lors de l'élimination des symbiotes dans le bacteriome du charançon. A) Autophagosome digérant <i>S. pierantonius</i> *. B) Corps multilamellaire, résultat de l'autophagie. C) Digestion d'un corps apoptotique. D) Marquage YO-PRO en vert révélant la cellule en apoptose et en Bleu l'ADN des noyaux marqués au DAPI chez des charançons symbiotiques et aposymbiotiques. E) Immunolocalisation de la caspase 3 active en vert et Hoechst marquant en bleu l'ADN des noyaux chez des charançons (Vigneron et al., 2014). .....	35
Figure 14 : Image en microscopie à fluorescence montrant l'organe lumineux d' <i>Euprymna scolopes</i> . En bleu les noyaux des cellules, en vert le marquage TUNEL marquant les noyaux des cellules en apoptose et en rose la rhodamine phalloïdine permettant de localiser les filaments d'actine (d'après (Peyer et al., 2018)).....	36
Figure 15 : Schéma représentant les différentes étapes des changements morphologiques de la cellule lors de l'apoptose.....	37
Figure 16 : Schéma représentant la voie de l'apoptose chez le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	38
Figure 17 : Activation des caspases lors de l'apoptose. En gris et bleu sont représentés les 2 sous-unités des caspases. En jaune le site actif, permettant de cliver les cibles de la caspase. En orange les boucles protégeant le site actif et le rendant inaccessible. Chez les caspases exécutrices, la région inter- domaine empêchant le déplacement de la boucle du site actif apparaît en vert. Lors de la dimérisation de la pro-caspase, la boucle orange est transloquée libérant ainsi le site actif en jaune. Chez les caspases exécutrices, le clivage de la région inter-domaine (en vert) permet le déplacement de la boucle orange et donc de la libération du site actif (d'après (Boatright and Salvesen, 2003)).....	39
Figure 18 : Schéma simplifié représentant les deux voies de l'apoptose chez la moule <i>Mytilus</i> <i>galloprovincialis</i> (Adapté d'après (Romero et al., 2015)).....	41
Figure 19 : Schéma du processus d'autophagie. Une portion de cytoplasme incluant des organites est enfermée par une membrane. Cet autophagosome fusionne avec un endosome afin de digérer le contenu (Mizushima, 2007).....	43
Figure 20 : Carte des sites hydrothermaux connus en 2011. Crédit : S. Beaulieu, K. Joyce, J. Cook, and S.A. Soule, Woods Hole Oceanographic Institution, 2015; funding from Woods Hole Oceanographic Institution, U.S. National Science Foundation #1202977, and InterRidge.....	48
Figure 21 : Photo d'une cheminée hydrothermale et de la moulière à sa base. Prise à Menez Gwen Station White Flame lors de la Campagne MOMARSAT/BioBaz 2017. © IFREMER.....	50
Figure 22 : Enregistrement de la température à un intervalle de 10 min pendant 24h dans 4 habitats aquatiques différents. En rouge, un habitat proche d'une sortie de fluide montrant la grande amplitude et l'aspect chaotique des variations. Adapté d'après (Bates et al., 2010). .....	51

Figure 23 : Photo d'un pockmark du site REGAB montrant des hydrates de méthane sur lesquels reposent des <i>Bathymodiolus aff boomerang</i> lors de la campagne WACS 2011 © IFREMER.....	52
Figure 24 : Réseau trophique d'une source hydrothermale représenté par 4 voies majeures (flèches vertes). Les bactéries utilisent l'énergie chimique des composés réduits des fluides comme le méthane et le sulfure d'hydrogène. Le plancton et les particules qui tombent, servent de nourriture aux suspensivores. Les bactéries chimiosynthétiques forment un tapis bactérien qui peut être consommé par les gastéropodes. D'autres bactéries chimiosynthétiques vivent en symbiose avec les vers tubicoles, les bivalves et les gastropodes qu'elles nourrissent. Les bactéries fournissent en échange du carbone à leur hôte. Puis les hôtes servent de nourriture aux prédateurs tels que les crabes, les poissons et les polychètes (Tunnicliffe, 1992).....	54
Figure 25 : Relations phylogénétiques entre espèces de moules et lien avec leurs habitats. Les moules des sources hydrothermales, des suintements froids, des bois coulés et des carcasses figurent en rouge, et en vert les <i>Mytilinae</i> comprenant les moules côtières <i>Mytilus edulis</i> (Distel <i>et al.</i> , 2000).....	56
Figure 26: Arbre Phylogénétique des moules chimiosynthétiques des abysses (Lorion <i>et al.</i> , 2013). .	57
Figure 27 : Détails de la branchie de <i>Bathymodiolus azoricus</i> et de ses endosymbiotes. A) Photo de la vue ventrale d'une <i>Bathymodiolus azoricus</i> ouverte provenant du site Menez Gwen (-840m) de la Dorsale Médio Atlantique (Campagne BioBaz 2017, Photos Bérénice Piquet). B) Schéma de la branchie d'après (Le Pennec and Hily, 1984) formant un W dont la partie dorsale est soudée aux tissus tandis que la partie ventrale pend dans la cavité palléale. Le carré rouge montre le sens d'une coupe transversale à travers les lamelles branchiales et montrée en C. C : Coupe transversale d'une lamelle branchiale avec la face frontale à droite, et abfrontale à gauche. Le DAPI (bleu) marque les noyaux des cellules, les marquages FISH montrent des bactéries sulfo-oxydantes (SOX, rose) et méthanotrophes (MOX, vert). Abréviations : H = hémolymphe ; IF = zone ciliée interfilamentaire ; TC = terminaison ciliée ; ZB = zones des bactériocytes.....	60
Figure 28 : A gauche : image prise en microscopie confocale avec un marquage FISH permettant de visualiser les endosymbiotes et un marquage DAPI permettant de visualiser l'ADN. En vert les bactéries méthanotrophes et en rouge les bactéries sulfo-oxydantes. A droite : image en microscopie électronique d'un bactériocytes de <i>Bathymodiolus azoricus</i> et les couleurs artificielles correspondant aux deux types de symbiotes. ....	62
Figure 29 : Schéma d'un bactériocyte montrant les voies métaboliques principales des symbiotes chez <i>Bathymodiolus azoricus</i> . En vert le symbiote sulfo-oxydant et en rouge le symbiote méthanotrophe. AT : transporteur d'ammonium, DH : déhydrogénase, DeNit : dénitrification, FormAsn : assimilation du formaldéhyde FormOx: oxydation du formaldéhyde en formiate et CO <sub>2</sub> , HydOx : oxydation de l'hydrogène, MetOx : oxydation du méthane par pMMO (complexe enzymatique méthane-monooxygénase) en méthanol puis NitAsn : assimilation de l'azote, NitRes : respiration de nitrate, NT : transporteur de nitrate, OxRes : phosphorylation oxydative avec l'oxygène	

comme accepteur d'électrons terminaux, SOX : oxydation du thiosulfate, SulfOx : oxydation du sulfure par la voie rDSR-APS-Sat, TCA : cycle de l'acide tricarboxylique, TRAP : transporteur périplasmique indépendant de l'ATP, T1SS : système de sécrétion de type I, T2SS : système de sécrétion de type II (Ponnudurai <i>et al.</i> , 2016) .....	64
Figure 30 : Image prise au microscope confocal. Marquage FISH permettant de visualiser les ectosymbiotes <i>Epsilonproteobacteria</i> des bathymodiales sur une coupe transversable de branchie de <i>B. azoricus</i> . En jaune, les <i>Epsilonproteobacteria</i> , en cyan les endosymbiontes (SOX+MOX) et en violet l'ADN de l'hôte (barre d'échelle = 20µm) (Assié <i>et al.</i> , 2016).....	65
Figure 31 : Concentrations des donneurs d'électrons dans les fluides normalisées en fonction de la température de 4 sites de sources hydrothermales de la dorsale Médio-Atlantique (en mmol.Kg <sup>-1</sup> ). Abréviations : MG, Menez Gwen; LS, Lucky Strike; Rb, Rainbow; SP, Snake Pit. Adapté d'après (Le Bris and Duperron, 2010).....	67
Figure 32 : Photos des deux types de remontées des échantillons A et B échantillonnage et remontée non isobare dans des boîtes fermées, C et D remontée isobare. A) Le ROV Victor 6000 dépose les moules dans la boîte. B) La boîte est remontée à la surface C) Le ROV Victor 6000 dépose des <i>B. azoricus</i> dans CROCO. D) Le ROV Victor 6000 insère CROCO dans PERISCOP qui maintiendra pression et température lors de la remontée. Photo A, C et D : ©Ifremer et B : Kamil Szafranski.....	72
Figure 33 : Plan de la thèse. Schéma regroupant les différentes campagnes pendant lesquelles les bathymodiales ont été échantillonnées et plan des différents chapitres de la thèse. Les numéros correspondent aux chapitres où sont présentés les résultats des analyses correspondantes. WACS : West Africa cold seeps ; BioBaz : Biologie Intégrée de <i>Bathymodiolus azoricus</i> ; BICOSE : Biodiversité, Interactions, COnnectivité et Symbiose en milieux Extrêmes ; MOMARSAT : Monitoring the Mid-Atlantic Ridge ; PH3 : Phospho-Histone H3, marqueur de la mitose ; FtsZ : Filamentous temperature sensitive mutant Z, marqueur de la division des bactéries ; BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine, nucléotide synthétique ; EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine, nucleotide synthétique...	73
Figure 34 : Carte des sites hydrothermaux de la ride Médio-Atlantique échantillonnés dans le cadre de la thèse. Carte réalisée sur Google Map.....	74
Figure 35 : Schéma représentant les différentes étapes de dissections, d'inclusions, de coupe et de marquage des branchies lors de la thèse. Les étapes indiquées par un thermomètre rouge sur les lames indiquent une incubation à chaud en étuve (37°C) et un thermomètre bleu une incubation sur glace..	80
Figure 36 : Photos de la branchie de <i>Bathymodiolus azoricus</i> marquée par un anticorps anti-phospho histone H3 en microscope confocale. A) Coupe transversale d'un filament de la branchie. En bleu, le signal DAPI montrant les noyaux des cellules de l'hôte et ses endosymbiotes et en rouge la phospho-histone H3. La flèche rouge pointe sur un hémocyte en cours de mitose. B) Coupe transversale d'un filament montrant une cellule en division. C) Coupe longitudinale de la branchie montrant de nombreuses divisions cellulaires du côté dorsal près de la masse viscérale. Mv : masse viscérale D)	

Coupe transversale d'un filament montrant une cellule épithéliale en cours de division. E)	
Aggrandissement de la figure D, montrant la cellule en division.....	85
Figure 37 : Schéma d'un filament de branchie coupé transversalement. Sur le schéma, 4 zones de comptages des noyaux ont été identifiées. ....	86
Figure 38 : Photo du dispositif permettant la balnéation des moules entières avec du BrdU. Les trois bocal sont remplis d'EDMF et placés dans un bain-marie permettant de maintenir la température à 8°C pendant toute l'expérimentation. Le tube permet un léger bullage afin de maintenir une quantité suffisante d'oxygène dans les bocal. On peut voir que certaines moules sont ouvertes et dans le bocal témoin, on aperçoit le pied (blanc) de 2 moules de <i>B. azoricus</i> du site de Menez Gwen (remontée non pressurisée). ....	90
Figure 39 : Images comparant des coupes transversales de filaments de branchie de <i>Bathymodiolus azoricus</i> , marqués au Hoechst, après avoir subi ou non une perméabilisation du tissu par l'acide chlorhydrique A). L'HCl provoque un signal fluorescent plus faible et moins spécifique des noyaux, la disparition de la zone ciliée et la disparition des noyaux, facilement identifiable sans ce bain. On observe encore les bactéries mais la branchie semble amincie. B). Dans la zone ciliée, on observe seulement des noyaux et dans la zone des bactériocytes, des noyaux (rond bleu dense) et les bactéries (patches bleus plus étalés mais moins denses). ....	94
Figure 40 : Deux filaments de branchie coupée transversalement. En vert le BrdU et en bleu d'ADN marqué par le Hoechst.....	95
Figure 41 : Schéma comparant le BrdU et l'EdU. Encadré en bleu : le nucléotide naturel, la thymidine. Encadré en vert : Le nucleotide synthétique, le BrdU. Le groupement méthyle CH <sub>3</sub> en 5' est remplacé par un atome de Brome. Le BrdU peut être révélé d'un anticorps qui se fixe sur l'atome de brome. Encadré en jaune : Le nucleotide synthétique, l'EdU. Le groupement méthyle CH <sub>3</sub> en 5' est remplacé par un groupement Alcyne. Une réaction dite « click-it® » permet de lier au groupement alcyne du nucleotide un azoture couplé à un fluorochrome. La réaction est catalysée par des ions cuivre. Noter la différence de taille entre l'anticorps anti-BrdU et l'azoture. Cette différence de poids moléculaire permet un protocole plus court pour l'EdU et moins d'étapes de perméabilisation des tissus. ....	96
Figure 42 : Schéma de la balnéation de branchies isolées avec deux types de nucléotides synthétiques dans trois concentrations différentes afin de comparer les deux types de marquages et de trouver la concentration donnant le meilleur résultat. Test réalisé sur les moules de Lucky Strike (remontée non pressurisées) sur une durée d'incubation de 2h lors de la Campagne de MOAMRSAT/BioBaz 2017. ....	98
Figure 43 : Photo de la balnéation d'une branchie isolée de <i>Bathymodiolus azoricus</i> dans de l'eau de mer contenant de l'EdU lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017. Des lames ont été placées dans le fond dans le but de permettre l'installation de potentiels symbiotes relargués par la branchie. ....	99

Figure 44 : Planche illustrant la multiplication cellulaire dans les branchies isolées, à trois concentrations d'EdU chez <i>Mytilus edulis</i> (3 à 100mg.L <sup>-1</sup> ). A) Noyaux en multiplication cellulaire, marqués par le FITC. B) Noyaux marqués par le Hoechst. C) Superposition des deux canaux.....	101
Figure 45 : Schéma montrant le marquage EdU tout le long d'une branchie de <i>Bathymodiolus azoricus</i> isolée lors d'une balnéation de 48h dans de l'eau de mer contenant 3µg.L <sup>-1</sup> . Le schéma en haut à gauche représente une branchie entière et les schémas sur la droite représentent les coupes transversales que l'on obtient en coupant la branchie de la partie ventrale (coupe 1) à la partie dorsale (coupe 14). Les photos en dessous sont les coupes transversales de la branchie au niveau de coupe successifs. En bleu, le marquage Hoechst montrant les noyaux et les bactéries et en jaune le marquage EdU. A) coupe transversale dans la partie dorsale de la branchie (niveau coupe 14) on note le nombre important de noyaux marqués. B et C) coupe transversale de la partie médiane de la branchie (niveaux coupes 6-7). D) coupe transversale de la partie ventrale de la branchie (niveau coupe 1). Les marquages EdU sont essentiellement localisés dans la partie frontale des filaments qui sont au contact avec l'eau de la cavité palléale. ....	103
Figure 46 : Photo de filaments de branchie de <i>Bathymodiolus azoricus</i> marquée par du EdU. Les deux photos ont été prises sur des branchies isolées et incubées avec une solution contenant 3mg.L <sup>-1</sup> d'EdU. En bleu le marquage Hoechst montrant les noyaux et les bactéries et en jaune les noyaux des cellules qui se sont multipliées pendant l'incubation. A) Un filament de branchie avec une zone ciliée frontale (TC : Terminaison Ciliée), une zone ciliée intercalaire (IC : interjonction ciliée) et la zone des bactériocytes. B) Détails d'une terminaison ciliée.....	104
Figure 47 : Photo prise au microscope confocal de filaments de branchie de <i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> du site de Snake Pit (remontée pressurisée et balnéation en aquarium pressurisée) marqués par du EdU. En bleu le marquage Hoechst montrant les noyaux et les bactéries et en jaune les noyaux des cellules qui se sont multipliées pendant l'incubation.....	105
Figure 48 : Photo d'un marquage à l'aide d'un anticorps anti-FtsZ sur un filament branchial de <i>Bathymodiolus azoricus</i> observé au microscope confocal A) Filament branchial de <i>B. azoricus</i> avec en bleu le signal DAPI qui montre l'ADN des noyaux et des bactéries et en vert le signal FtsZ. B) Photo du même filament montrant uniquement le signal DAPI. C) En vert sur le même filament le signal de la protéine FstZ qui ne semble pas être co-localisé avec les bactéries endosymbiotes, mais davantage du côté basal des bactériocytes, où les mitochondries sont abondantes (sans qu'on puisse à ce stade montrer que le signal soit associé aux mitochondries).....	111
Figure 49 : Photo en MET de <i>Bathymodiolus azoricus</i> montrant des figures de division de symbiotes A) Figure de division de deux bactéries sulfo-oxydantes. Les flèches en noir montrent les deux jeux d'ADN. B) Figure de division de bactéries méthanotrophes. La flèche montre que les deux bactéries sont encore reliées.....	112

- Figure 50 : Photo prise en microscopie électronique de bactériocytes de *Bathymodiolus azoricus* venant d'être remontée du site Menez Gwen. Les flèches montrent des possibles figures d'endocytose ou d'exocytose. .... 114
- Figure 51 : Photo prise en microscopie confocale d'une lame placée 48h dans une boîte de Pétri en présence d'une branchie isolée de *Bathymodiolus azoricus* du site Lucky Strike. En haut à gauche la superposition des 3 canaux. En haut à droite, le marquage DAPI se fixant sur l'ADN. En bas à gauche, la sonde EUB338 marquant toutes les eubactéries. En bas à droite, la sonde EPSY549 marquant les *Epsilonproteobacteria*, non présente sur la lame. Barre d'échelle : 25µm. .... 184
- Figure 52 : Photo prise en microscopie confocale d'une lame placée 48h dans une boîte de Pétri en présence d'une branchie isolée de *Bathymodiolus azoricus* du site Lucky Strike. En haut à gauche la superposition des 3 canaux. En haut à droite, le marquage DAPI se fixant sur l'ADN. En bas à gauche, la sonde EUB338 marquant toutes les eubactéries. En bas à droite, la sonde GAM42 marquant les *Gammaproteobacteria*, très abondantes. Barre d'échelle : 25µm..... 185
- Figure 53 : Photo prise en microscopie confocale d'une lame placée 48h dans une boîte de Pétri en présence d'une branchie isolée de *Bathymodiolus azoricus* du site Lucky Strike. En haut à gauche la superposition des 3 canaux. En haut à droite, un marquage DAPI se fixant sur l'ADN. En bas à gauche, la sonde ImedM138 marquant les bactéries symbiotiques méthanotrophes de bathymodiales, abondantes et reconnaissables à leur forme de « donut » (Duperron *et al.*, 2005). En bas à droite, la sonde BangT642 marquant les bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes de bathymodiales, apparemment absentes. Barre d'échelle : 25µm. .... 186
- Figure 54 : Photo au microscope confocal des filaments de branchie de *Bathymodiolus azoricus* du site de Menez Gwen. En bleu, on peut voir les noyaux colorés en DAPI, en vert les bactéries méthanotrophes et en rouge les bactéries sulfo-oxydantes. A) T = 0h. B) Après 8 jours de jeûne. C) Après 16 jours de jeûne. D) Après 61 jours de jeûne. (Barre d'échelle = 100µm). .... 191
- Figure 55 : Photo de la zone des bactériocytes de *Bathymodiolus azoricus* témoin de la remontée prise au microscope électronique à transmission. A) Moule de Menez Gwen venant de remonter de son site. Les flèches montrent les microvillosités développées du bactériocyte. B) Détails d'un bactériocyte dans une moule de Menez Gwen. Les deux types de symbiotes sont isolés dans des vacuoles différentes. C) détails d'un corps multilamellaire près de la lame basale. D) Détails d'un bactériocyte d'une moule de Lucky Strike. Les deux types de symbiotes sont localisés dans la même vacuole. Les flèches montrent des bactéries sulfo-oxydantes dégradées. E) Photo d'un corps apoptotique. N : noyau ; CM : corps multilamellaires ; LB : Lame basale ; SOX bactérie sulfo-oxydante ; MOX bactérie méthanotrophe. .... 192
- Figure 56 : Photo au microscope électronique à transmission d'un détail d'un bactériocyte d'un témoin de *B. azoricus* du site Menez Gwen. Les flèches noires près du milieu externe montrent des bactéries

sulfo-oxydantes seules dans une vacuole. Les flèches blanches montrent des bactéries sulfo-oxydantes en grand nombre dans une vacuole.....	193
Figure 57 : Détails d'un corps multilamellaire dans un bactériocyte d'un témoin de <i>Bathymodiolus azoricus</i> du site Menez Gwen. A) Photo d'un bactériocyte avec de nombreuses bactéries méthanotrophes et d'une vacuole contenant des bactéries sulfo-oxydantes. B) Agrandissement du cadre de la photo A. C) Agrandissement du cadre de la photo B. Les flèches noires montrent les lamelles qui entourent des bactéries sulfo-oxydantes en cours de digestion.....	196
Figure 58 : Photo en microscopie électronique de <i>Bathymodiolus azoricus</i> venant d'être remontée de son site. A) Entre deux cellules intercalaires en parfait état, on observe une zone vide et quelques corps multilamellaires. B) Une cellule intercalaire et une cellule dégradée à coté.....	196
Figure 59 : Photo en microscopie électronique de <i>Bathymodiolus azoricus</i> ayant jeûné 8 jours. A) Photo d'un bactériocyte après 8 jours de jeûne. B) Bactérie sulfo-oxydante qui fusionne avec une vésicule que la flèche noire montre. C) Bactérie méthanotrophe « abîmée », les membranes sont distendues.....	197
Figure 60 : Photo des filaments de branchie de <i>Bathymodiolus azoricus</i> et de <i>Mytilus edulis</i> prise au MET. A) Moule de Menez Gwen après 61 jours de jeûne. B) Détails de la photo précédente. La flèche montre les microvillosités de la cellule. C) Photo d'un filament de branchie de <i>Mytilus edulis</i> . D) Cellule de la branchie de <i>Bathymodiolus azoricus</i> après 61 jours de jeûne. La cellule se résume à un noyau et à un cytoplasme réduit. N : noyau.....	198
Figure 61 : Photo d'un détail d'une cellule de <i>Bathymodiolus azoricus</i> ayant jeûné 2 semaines. Les flèches montrent une double membrane qui entoure une partie du cytoplasme.....	199
Figure 62 : Schéma représentant une coupe transversale d'un filament de branchie de <i>Bathymodiolus azoricus</i> montrant les zones de multiplication et de mort cellulaire. En orange sont représentées les cellules qui se multiplient et en bleu les cellules qui sont en apoptose.....	205
Figure 63 : Schéma représentant un bactériocyte de <i>Bathymodiolus azoricus</i> et l'hypothèse du devenir des symbiotes. Les symbiotes seraient endocytés depuis le milieu extérieur puis les bactéries pourraient se multiplier dans une vacuole qui serait ensuite digérée, transférant alors le carbone à l'hôte.....	211
Figure 64 : Expérience de filtration chez <i>Bathymodiolus azoricus</i> et <i>Mytilus edulis</i> . A) Photo des ballons contenant, de gauche à droite : 3 <i>Mytilus edulis</i> , 3 <i>Bathymodiolus azoricus</i> et 3 coquilles vides. La photo a été prise au début de l'expérience et les 3 ballons ont la même couleur verte due aux microalgues. B) Après 2h l'eau du ballon des <i>Mytilus edulis</i> s'est éclaircie. C) Après 4h, on peut noter que l'eau du ballon des moules côtières est totalement transparente. D) Photo prise à la fin de l'expérience. Le ballon des moules des sources hydrothermales est toujours coloré en vert tout comme le ballon témoin. La flèche montre une bathymodiologie qui se déplace dans le ballon, preuve que les moules se sont ouvertes pendant l'expérience. E) Photo des coquilles vides et de la colle qui a servi à	

fabriquer les fausses moules. F) Graphique montrant la concentration en microalgues dans les trois ballons pendant 24h. ....	236
Figure 65 : Photo de <i>Bathymodiolus azoricus</i> du site Menez Gwen. A) La moule vient d'être remontée du site B) La moule a été maintenue dans un aquarium avec de l'eau de mer à 8°C nourrie avec des <i>T-Isochrysis</i> pendant 1 an. ....	238
Figure 66 : Photo de la maintenance des <i>Bathymodiolus azoricus</i> en aquarium. A) Photo de deux bathymodiales ouvertes. Les flèches montrent leurs siphons inhalant et exhalant sortis. B) Photo d'une bathymodiale qui se déplace dans l'aquarium. La flèche montre le pied. C) Ovocytes primaires provenant d'un frottis de gonade de bathymodiale maintenue 11 mois à Roscoff. ....	239
Figure 67 : Schéma expliquant l'expérimentation réalisée pendant la campagne WACS 2011 .....	240



## 9 TABLE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Tableau résumant la symbiose chez nos 6 exemples en comparaison avec notre modèle d'étude <i>Bathymodiolus spp.</i> Les cellules de l'hôte abritant les symbiotes intracellulaires sont appelées bactériocytes. ....	15
Tableau 2 : regroupant les différents types de mort cellulaire régulées (Kroemer <i>et al.</i> , 2005, 2009; Boya and Kroemer, 2008; Galluzzi <i>et al.</i> , 2012, 2015, 2018; Kepp <i>et al.</i> , 2014; Muñoz-Pinedo and Martin, 2014; Liu and Levine, 2015; Pasparakis and Vandenabeele, 2015). ' - ' = non renseigné. ....	45
Tableau 3 : Minéraux et gaz dans les fluides purs sortant des cheminées de 3 sites de la ride Médio-Atlantique en comparaison avec l'eau de mer du fond. Extrait de Charlou <i>et al.</i> , 2002. ....	49
Tableau 4 : Tableau regroupant les différentes espèces de moules étudiées pendant la thèse (Duperron, 2010; Hayward <i>et al.</i> , 2014). ....	58
Tableau 5 : Tableau regroupant les différentes techniques utilisées pendant la thèse ....	68
Tableau 6 : Comptage des noyaux marqués par l'anticorps anti-phospho-histone H3 chez <i>B. azoricus</i> . Quatre individus du site Rainbow (tous remontées pressurisées) et 3 individus de Menez Gwen, (soit au total 8 individus, représentés par 12 lames portant chacune plusieurs filaments branchiaux) ont été analysés). ZB : zone des bactériocytes. ....	87
Tableau 7 : Tableau listant les balnéations de BrdU effectuées sur <i>Bathymodiolus azoricus</i> lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017 et à terre au Roscoff Aquarium Service. PP? : Navire Océanographique Pourquoi pas? ; Deep Lab Horta : Lab Horta est le laboratoire de l'Université eds Açores basé à Horta. ....	92
Tableau 8 : Tableau listant les filtres réalisés lors de la campagne MOMARSAT/BioBaz 2017. Chaque ligne correspond à un filtre. La première colonne, la provenance des moules de l'expérience. La deuxième colonne, le nombre de jours depuis leur remontée donc depuis combien de jours les moules commencent à perdre leurs symbiotes. La troisième colonne indique le milieu dans lequel les moules ou les branchies ont été gardées pendant l'expérience. Et la dernière colonne, le temps que les moules ou les branchies ont passé dans le milieu décrit colonne 3, avant que l'eau ne soit filtrée. En gras, l'expérience menée sur branchie isolée dont les résultats sont présentés dans la suite du paragraphe. ....	180
Tableau 9 : Sondes couplées à un fluorochrome utilisées pour le marquage des bactéries lors de la méthode FISH. ....	182
Tableau 10 : Taille des individus ayant servi à l'expérience de filtration. ....	235



## Résumé : **La flexibilité des symbioses entre bivalves et bactéries chimiotrophes : mécanismes, régulation et résilience**

La symbiose entre les moules du genre *Bathymodiolus* et des bactéries sulfo-oxydantes et des méthanotrophes localisées dans les branchies permet à ces bivalves de vivre dans des environnements hostiles comme les sources hydrothermales sous-marines. Cette symbiose est flexible car l'abondance de chaque symbiote varie suivant la disponibilité de ses substrats. Notre objectif était d'étudier les mécanismes qui sous-tendent cette flexibilité à partir notamment d'expérimentations en aquariums, pressurisés ou non. La multiplication cellulaire dans la branchie, suivie à l'aide d'un marqueur de la mitose et par incorporation de nucléotides synthétiques, a montré des zones de multiplication dans la zone ciliée et la région dorsale de la branchie. L'apoptose, quantifiée par des marquages spécifiques, montre que les branchies des *Bathymodiolus* présentent un taux d'apoptose plus élevé qu'une moule côtière dépourvue de symbiotes. Ce sont surtout les bactériocytes les moins riches en symbiotes qui sont en apoptose, invalidant l'hypothèse d'une régulation directe des quantités de symbiotes par apoptose. La comparaison avec l'espèce côtière, *Mytilus edulis* montre un turn-over particulièrement important de la zone ciliée des *Bathymodiolus*, une possible adaptation à la symbiose et à l'environnement. La branchie d'une moule maintenue en l'absence des substrats de ses symbiotes change et présente des similarités avec celle de la moule côtière. Les *Bathymodiolus* relarguent de faibles quantités de leurs deux types de symbiotes, ce qui pourrait participer à la transmission latérale des symbiotes aux moules voisines. Cette première approche intégrée des mécanismes impliqués dans la flexibilité de la symbiose ouvrent de nouvelles pistes sur la manière dont hôte et symbiotes dialoguent.

Mots clés : [*Bathymodiolus azoricus*, *Bathymodiolus puteoserpentis*, *Mytilus edulis*, symbiose, sources hydrothermales, branchie, apoptose, multiplication cellulaire, division symbiotes, relargage des symbiotes]

## Abstract : **Flexibility of the symbiosis between Bivalves and chemosynthetic bacteria : mechanism, control and resilience**

Symbiosis between mussels of the genus *Bathymodiolus* and sulfur-oxidizing and methanotrophic bacteria located in their gills enables these bivalves to live in harsh environments, such as deep-sea hydrothermal vents. This symbiosis is flexible, as the abundance of each symbiont varies according to the available chemical substrata. Our goal was to investigate mechanisms underlying this flexibility based on experiments in vessels, pressurized or not. Cell proliferation in gills, monitored by immunolabelling of mitosis markers and by in vivo incorporation of synthetic nucleotides, showed multiplication areas in the ciliated zone and the dorsal region of the gills. Apoptosis, quantified by specific labelling, shows that *Bathymodiolus* gills display a higher apoptotic rate than coastal mussels without symbionts. Bacteriocytes with a low symbiont content are most frequently undergoing apoptosis, which invalidates the hypothesis of a direct regulation of the quantity of symbionts by apoptosis. The comparison with the coastal mussel *Mytilus edulis* enabled us to show an high cell turnover rate in the ciliated zone of *Bathymodiolus*, a possible adaptation to symbiosis and to the environment. The mussel gills maintained without substrates for the symbionts changed, and ended up displaying similarities with those of coastal mussels. *Bathymodiolus* releases little amounts of both types of symbionts, This could facilitate lateral transmission of the symbionts to neighbouring mussels. This first integrative approach of the mechanisms involved in symbiosis flexibility opens new perspectives on the way hosts and symbionts interact.

Keywords : [*Bathymodiolus azoricus*, *Bathymodiolus puteoserpentis*, *Mytilus edulis*, symbiosis, hydrothermal vents, gills, apoptosis, cell proliferation, symbiont division, symbiont release]