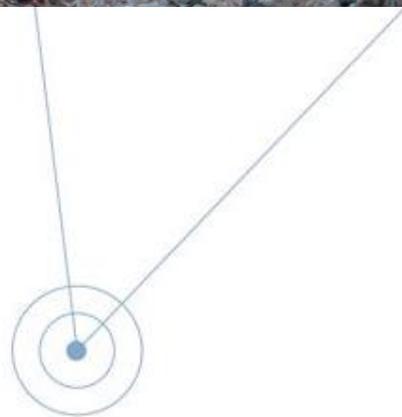
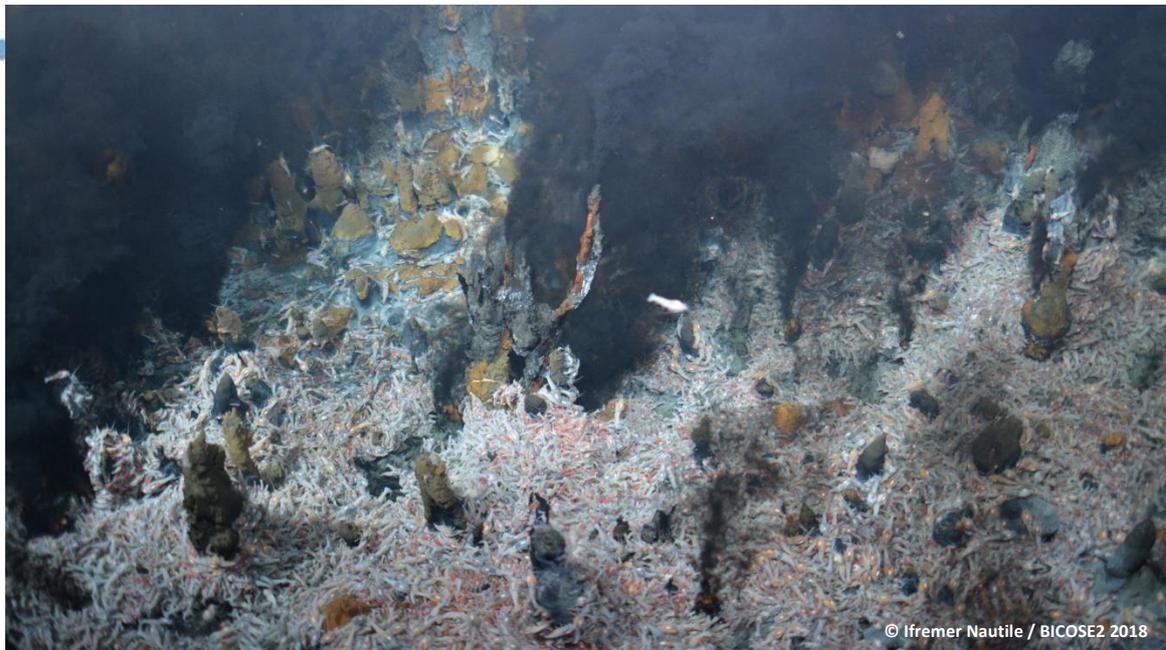


MISSION BICOSE2 – du 27 janvier au 11 mars 2018

Rapport scientifique de l'équipe symbiose



Fiche documentaire

Titre du rapport : Compte-rendu scientifique du groupe symbiose de la mission BICOSE2 du 27 janvier au 11 mars 2018.	
Référence interne : REM/EEP/LM2E-2018 Diffusion : <input type="checkbox"/> libre (internet) <input type="checkbox"/> restreinte (intranet) – date de levée d’embargo : AAA/MM/JJ <input checked="" type="checkbox"/> interdite (confidentielle) – date de levée de confidentialité : 2023-12-31	Date de publication : 2018-03-25 Version : 1.0.0 Référence de l’illustration de couverture Ifremer/préleveur FISH en cours de prélèvement/2019-01-21 Langue(s) : Fr
Résumé/ Abstract :	
Mots-clés/ Key words : BICOSE2, symbiose, Rimicaris, FISH	
Comment citer ce document :	
Disponibilité des données de la recherche :	
DOI :	

Commanditaire du rapport :	
Nom / référence du contrat :	
<input type="checkbox"/> Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX) <input checked="" type="checkbox"/> Rapport définitif	
Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit (programme européen, campagne, etc.) :	
Auteur(s) / adresse mail	Affiliation / Direction / Service, laboratoire
Valérie CUEFF-GAUCHARD / vcueff@ifremer.fr	REM/EEP/LM2E
Marie-Anne CAMBON-BONAVITA / macambon@ifremer.fr	REM/EEP/LM2E
Ivan HERNANDEZ-AVILA	Université de Mexico, Mexique
Laurent BIGNON / Laurent.Bignon@ifremer.fr	REM/EEP/LEP
Encadrement(s) :	
Destinataire :	
Validé par :	

Sommaire

Table des matières

1	Symbiose chez les Alvinocaridés.....	7
1.1	Etat de l'art.....	7
1.2	Fonctionnement des communautés symbiotiques chez la crevette hydrothermale <i>Rimicaris</i> sp. par approches <i>in situ</i>	9
1.2.1	Objectifs.....	9
1.2.1.1	Etude du métatranscriptome à partir de prélèvements avec la boîte FISH vs des remontées d'individus en PERISCOP vs des remontées d'individus avec l'aspirateur à faune du Nautile.....	10
1.2.1.2	Comparaison du métatranscriptome tel qu'exprimé au fond dans les conditions naturelles de vie avec les métatranscriptomes obtenus suite à des incubations en IPOCAMP© avec des substrats énergétiques fixés.....	10
1.2.2	Matériel et méthodes.....	10
1.2.2.1	Prélèvements avec la boîte FISH vs des remontées d'individus en PERISCOP vs des remontées d'individus avec l'aspirateur à faune du Nautile.....	10
1.2.2.2	Incubations en IPOCAMP© avec différentes sources d'énergie.....	11
1.2.3	Expériences réalisées.....	12
1.2.3.1	Prélèvements avec la boîte FISH vs des remontées d'individus en PERISCOP vs des remontées d'individus avec l'aspirateur à faune du Nautile.....	12
1.2.3.2	Incubations en IPOCAMP© avec différentes sources d'énergie.....	12
1.2.3.3	Extractions d'ARN.....	13
1.3	Fonctionnement des communautés symbiotiques chez la crevette hydrothermale <i>Rimicaris</i> sp. : mise au point de FISH (hybridation <i>in situ</i> fluorescente) sur ARNm.....	13
1.3.1	Objectifs.....	13
1.3.2	Matériel et méthodes.....	13
1.3.3	Expériences réalisées.....	14
1.4	Transfert de substrat marqué en ¹⁴ C chez <i>Rimicaris exoculata</i> et <i>Rimicaris chacei</i> à différents stades de vie.....	14
1.4.1	Objectif.....	14
1.4.2	Matériel et méthodes.....	14
1.4.2.1	Juveniles.....	15
1.4.2.2	<i>Rimicaris exoculata</i> ovigère.....	15
1.4.2.3	<i>Rimicaris chacei</i> adulte.....	16
1.4.3	Expériences réalisées.....	16
1.4.4	Dépouillement à terre.....	17

1.5	Comparaison de la diversité des symbiontes des mâles <i>Rimicaris exoculata</i> situés en périphérie des sites vs celle des mâles au sein des agrégats denses vs celle des femelles au sein des agrégats	17
1.5.1	Objectifs	17
1.5.2	Matériel et méthodes	17
1.5.3	Expériences réalisées	18
1.5.4	Dépouillement à terre.....	18
1.6	Toxicité du cuivre et du zinc chez <i>Rimicaris exoculata</i>	18
1.6.1	Objectifs	18
1.6.2	Matériel et méthodes	19
1.6.3	Expériences réalisées	20
1.7	Conditionnement de divers types de crevettes pour assurer des stocks au laboratoire 20	
1.7.1	Objectifs	20
1.7.2	Matériel et méthodes	21
1.7.3	Stocks réalisés	21
1.8	Bilan des objectifs atteints.....	22
	Références bibliographiques	23
2	Rapport technique sur boîte FISH	25
2.1	Présentation de l'outil.....	25
2.2	Protocole de mise en œuvre par le Nautille	26
2.3	Problèmes techniques rencontrés lors de la mise en œuvre sur la mission BICOSE2... 27	
2.3.1	Manipulation de la boîte, remplacement par une autre boîte de prélèvement ou par le raccord droit	27
2.3.2	Fonction prélèvement de faune mobile	29
2.3.3	Fonction fermeture du couvercle	29
2.3.4	Injection du fixateur.....	30
2.3.5	Fonction de broyage.	31
2.3.6	Transfert de la boîte de prélèvement dans l'ascenseur	31
2.4	Bilan des prélèvements.....	31

1 Symbiose chez les Alvinocaridés

1.1 Etat de l'art

Les milieux extrêmes profonds sont des écosystèmes privés de lumière, où les micro-organismes chimiolithoautotrophes sont les principaux producteurs primaires. La faune peut alors soit les ingérer, soit établir des associations allant de la simple phorésie à des symbioses vraies (relation mutualiste durable à bénéfiques réciproques). L'établissement de symbioses entre les invertébrés et les micro-organismes permet la colonisation de nouveaux environnements *a priori* hostiles pour la faune. Dans ces milieux extrêmes, les exemples de symbioses bactériennes sont donc nombreux. Plusieurs degrés d'associations peuvent exister allant de l'épibiose (les micro-organismes sont présents à l'extérieur des tissus de leur hôte, comme chez le ver de Pompéi *Alvinella pompejana* et la crevette aveugle *Rimicaris exoculata*) à l'endosymbiose (internalisation des micro-organismes dans des cellules spécialisées de l'hôte, comme dans le trophosome du ver géant *Riftia pachyptila* ou les branchies des bivalves Bathymodiolinae). Dans le cas des endosymbioses, où le tube digestif de l'hôte est fortement réduit, voire absent, les bactéries ont un rôle nutritif certain pour l'hôte. Ces bactéries sont capables d'utiliser l'énergie chimique de l'environnement pour fixer le CO₂ en matière organique par chimiosynthèse pour assurer la nutrition de l'hôte. Dans le cas des épibioses, la présence d'un tube digestif complet et fonctionnel rend leur rôle plus énigmatique.

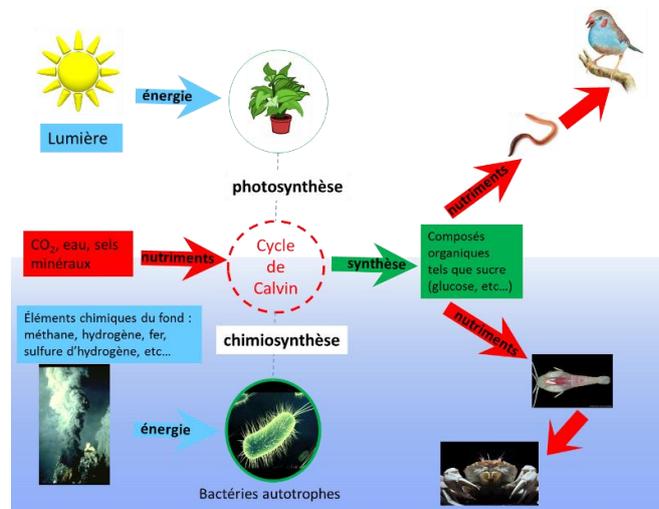


Figure 1 : schéma chimiosynthèse vs photosynthèse

Rimicaris exoculata (Williams and Rona, 1986) est probablement le crustacé le plus étudié dans les milieux profonds, en raison de son importance dans les écosystèmes hydrothermaux de la Ride Médio-Atlantique et de sa remarquable biologie (Schmidt et al., 2008; Segonzac et al., 1993; Van Dover et al., 1988). La cavité céphalothoracique des adultes est élargie et presque close, emprisonnant des chélicères réduits. Certaines pièces buccales présentent une hypertrophie caractéristique, ainsi que de nombreuses soies, sur lesquelles sont observées d'abondantes populations de bactéries filamenteuses épibiontes. Ces micro-organismes sont principalement localisés sur la partie dorsale de la cavité, là où le flux d'eau sortant est appauvri en oxygène et enrichi en gaz carbonique (Zbinden et al., 2004). L'ensemble de ces évolutions anatomiques ont été interprétées comme étant une sorte de « chambre de culture » pour les micro-organismes, micro-organismes dont la crevette pourrait alors se nourrir (Gebbruk et al., 2000; Segonzac et al., 1993) supposant ainsi une épibiose nutritionnelle.



Figure 2 : photo *R. exoculata*

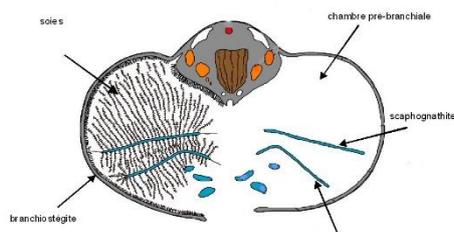


Figure 3 : schéma de la cavité branchiale

Si les premières études semblaient indiquer une diversité limitée aux Epsilonproteobactéries (Polz and Cavanaugh, 1995), les résultats récents indiquent la présence d'une diversité plus importante avec notamment des Gammaproteobactéries et des Zetaproteobactéries et de plusieurs métabolismes (Guri et al., 2012; Hugler et al., 2011; Jan et al., 2014; Petersen et al., 2009; Zbinden et al., 2008). Cela inclut l'oxydation du soufre, du fer, du méthane et même de l'hydrogène.

Un deuxième compartiment chez *R. exoculata* abrite une communauté microbienne bien distincte de celle de la tête au niveau du tractus digestif. Concernant le tractus digestif, cet animal possède un petit estomac au regard de sa taille (Segonzac et al., 1993). Le tube digestif est long, recouvert à ses extrémités de cuticule, éliminée à chaque mue. Le mésentéron, partie médiane relativement longue, est dépourvue de cuticule et est le lieu privilégié de l'absorption intestinale. Le bol alimentaire a l'aspect d'une pâte gris-noir, composée de sulfures et d'oxydes de fer. Une communauté microbienne peu diversifiée et distincte de celle identifiée dans l'environnement y a été mise en évidence (Durand et al., 2015; Durand et al., 2010; Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003) incluant des Deferribacteria, Mollicutes, Epsilon- et Gammaproteobactéries, qui forment une communauté bactérienne résidente. Bien que la lumière de la partie antérieure de l'intestin jusqu'à l'estomac soit enlevée à chaque mue, l'intestin moyen est dépourvu de cuticule et héberge la plupart des bactéries, ce qui représente un compartiment épisymbiotique interne de la crevette. Mais le rôle de ces symbiontes reste énigmatique.

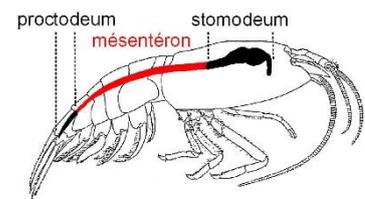


Figure 4: schéma du système digestif

Par ailleurs, des expériences avec des composés marqués (isotopes stables de carbone inorganique et composés inorganiques et organiques radiomarqués) ont démontré le transfert nutritionnel direct de ces substrats depuis les bactéries vers la crevette, en particulier de celles qui vivent dans la chambre branchiale, ce qui pourrait représenter la principale source de nutrition pour la crevette (Ponsard et al., 2013). Des sources nutritionnelles supplémentaires pourraient inclure l'ingestion des bactéries provenant de l'exuvie de crevette, des activités de la microflore intestinale et des bactéries présentes sur les murs de la cheminée hydrothermale où vivent les crevettes (Corbari et al., 2008; Durand et al., 2010; Segonzac et al., 1993; Van Dover et al., 1988; Zbinden et al., 2004)

Il existe des preuves récentes de la différenciation géographique des symbiontes ainsi qu'au cours du cycle de vie sur différents compartiments de *R. exoculata* (Cowart et al., 2017; Durand et al., 2010; Le Bloa et al., 2017; Petersen et al., 2009). De plus, la ségrégation sexuelle et par stade de vie des crevettes a été observée le long des différents habitats de l'écosystème (Hernandez-Avila et al. in prep.). Ces observations soulèvent des questions sur la relation entre la ségrégation de l'habitat de l'hôte, la composition bactérienne symbiotique et les fonctions putatives liées à la chimiosynthèse tout au long du cycle de vie, ce qui a déjà été exploré par des analyses préliminaires (Hernandez-Avila et al., 2015). Il subsiste donc encore des inconnues dans la compréhension du cycle de vie de *R. exoculata*, de sa biologie, de sa reproduction, de sa dispersion et au niveau de ses bactéries symbiotiques.

De plus, il y a des questions similaires sur une autre crevette hydrothermale, présente également sur les mêmes sites, *Rimicaris chacei* et sur le rôle de ses communautés symbiotiques. Cette dernière, autrefois nommée *Chorocaris chacei* (Vereshchaka et al., 2015) vit en petits groupes d'individus autour des agrégats denses de *Rimicaris exoculata*. Son céphalothorax présente une hypertrophie nettement moins marquée mais celui-ci héberge aussi des bactéries filamenteuses mais en moindre quantité au regard de *Rimicaris exoculata* (Segonzac et al., 1993). Par contre, son estomac est moins réduit et elle semble avoir un régime alimentaire mixte : symbiose et prédation. Aujourd'hui cette espèce est moins étudiée car peu représentée sur les sites et relativement difficile à prélever. Les différents compartiments comportant des bactéries associées (chambre branchiale et tractus digestif) ont démontré une diversité bactérienne très proche de celle de *Rimicaris exoculata* (Apremont et al., in prep).



Figure 5: photo de *R. chacei*

Le but de ce rapport est de décrire les échantillonnages et les différentes expérimentations menées en laboratoire durant la campagne BICOSE2 concernant l'étude de la composition des bactéries symbiotiques de *R. exoculata* et *R. chacei* et l'expression fonctionnelle.

1.2 Fonctionnement des communautés symbiotiques chez la crevette hydrothermale *Rimicaris* sp. par approches *in situ*

Participants à bord : Valérie Cueff-Gauchard, Ivan Hernandez-Avila, Marie-Anne Cambon-Bonavita.

Aide de Bruce Shillito et Louis Amand pour récupération des crevettes dans Periscop© et incubations dans IPOCAMP©.

1.2.1 Objectifs

Chez *Rimicaris exoculata*, de nombreuses questions restent ouvertes sur le fonctionnement des bactéries de la tête en fonction de la chimie présente dans son environnement proche, et le rôle des communautés microbiennes présentes dans le tractus digestif reste à élucider.

Jusqu'ici, les études réalisées au laboratoire ont permis d'obtenir des pistes et des réponses partielles grâce à des incubations à bord en aquariums pressurisés (Shillito et al., 2001) dans lesquels peuvent être incubés nos animaux modèle avec différents types de substrats (sulfures, fer, méthane, hydrogène, etc...), mimant les conditions présentes au fond. Ainsi, certains métabolismes actifs ont pu être mis en évidence par la présence d'ARNm codant pour des enzymes impliquées dans des voies métaboliques précises (RT-PCR, Q-RT-PCR). Par ailleurs, des résultats obtenus en métatranscriptomique suite à différents types d'incubations sur la mission BICOSE1 sont en cours d'exploitation au laboratoire. Mais ces expériences n'activent que certaines voies métaboliques, substrat par substrat. Elles ne permettent pas d'avoir une vue d'ensemble de ce qui est actif *in situ*.

Au cours de ces études, les spécimens vivants ont été récoltés avec les aspirateurs à faune des sous-marins Nautille ou ROV Victor 6000, remontés soit avec l'engin (bols de l'aspirateur), soit à l'aide d'un compensateur de pression, PERISCOP® (Shillito et al., 2008). Malheureusement, ces techniques de récolte ne permettent pas de préserver la totalité des ARNm présents dans l'organisme au moment de son prélèvement, témoins de signatures métaboliques actives. En effet, chez *Escherichia coli* par exemple, les ARNm ont une durée de vie comprise entre 3 et 8 min. Or, entre le moment de prélèvement des animaux *in situ* et leur récupération à bord, il se passe souvent plusieurs heures, le temps de remontée dépendant de la profondeur et du type d'engin sous-marin utilisé. Les animaux, soustraits à leurs conditions de vie naturelles, sont stressés durant la remontée, ce qui entraîne un biais dû au remaniement transcriptomique d'adaptation à ces conditions de stress. La perte de signal a été évaluée selon certaines études à environ 90%. Il est donc impossible d'avoir une vision globale des métabolismes actifs chez les bactéries présentes sur des animaux ainsi conditionnés. L'hybridation *in situ*, utilisée au laboratoire sur l'ARNr16S, plus stable, ne peut donc pas être appliquée aux ARNm. Or, cette utilisation sur ARNm permettrait d'identifier des microorganismes et d'inférer des métabolismes par co-localisation.

Plusieurs équipes se sont déjà penchées sur la réalisation de systèmes de prélèvement permettant la fixation *in situ* de sédiments ou dans la colonne d'eau et ont démontré leur intérêt (Edgcomb et al., 2016). Une équipe américaine a développé un système, l'ISMASH, permettant la fixation *in situ* d'animaux, associée à leur broyage (Sanders et al., 2013) mais leur système ne permet pas de prélever des animaux mobiles tels que les crevettes.

Il est donc apparu intéressant d'associer un sujet de thèse sur le « Fonctionnement des communautés symbiotiques chez la crevette hydrothermale *Rimicaris* sp. par approches *in situ* » au développement d'un nouvel outil permettant de fixer les animaux mobiles *in situ* : FISH (Fixateur In-situ de Substrats Homogénéisés - ANR Carnot DEEPECOS).

L'objectif porte sur l'analyse des métabolismes microbiens actifs (ARNm) chez *Rimicaris exoculata* dans son environnement naturel, étudiés via des approches de métatranscriptomique et de RT-PCR, RT-Q-PCR. Ceci permettra d'élucider le fonctionnement des communautés microbiennes et de mieux comprendre leur rôle. Sur le plan méthodologique, ce projet de thèse permettra de valider un nouvel outil de collecte développé au

laboratoire, couplant le prélèvement de faune mobile et la fixation *in situ* des échantillons (boîte FISH, projet Carnot DEEPECOS). Ces objectifs se déclinent sous forme de 2 types d'expériences :

- 1.2.1.1 Etude du métatranscriptome à partir de prélèvements avec la boîte FISH vs des remontées d'individus en PERISCOP vs des remontées d'individus avec l'aspirateur à faune du Nautilé

L'objectif principal est de valider le principe de la boîte FISH qui permet de fixer les ARN au fond avec du RNA later en comparant le métatranscriptome tel qu'exprimé au fond avec une fixation immédiate après la soustraction aux conditions de vie environnementales avec le métatranscriptome encore actif après le temps de remontée (PERISCOP et bols aspirateur à faune) tant en termes de quantités d'ARNm que de leur qualité. Cette expérience était à réaliser sur chacun des sites TAG et Snake Pit.

- 1.2.1.2 Comparaison du métatranscriptome tel qu'exprimé au fond dans les conditions naturelles de vie avec les métatranscriptomes obtenus suite à des incubations en IPOCAMP© avec des substrats énergétiques fixés.

Lors de BICOSE1, des incubations dans IPOCAMP© avaient déjà été réalisées avec différentes sources d'énergie permettant l'activation de voies métaboliques bactériennes spécifiques, substrat par substrat (H₂, CH₄, soufre, fer). Mais les conditionnements n'avaient pas été prévus pour étudier l'ARN bien que les échantillons aient servis à une étude en cours de traitement des données (post-doc Julie Réveillaud). C'est pourquoi il paraît intéressant d'étudier à nouveau le métatranscriptome exprimé durant les incubations selon la source d'énergie apportée (accepteur d'électron) en comparaison du métatranscriptome exprimé au fond (conditionnements à partir des fixations avec la boîte FISH) pour compléter les données de Julie Réveillaud avec un conditionnement adéquat. Ces expériences d'incubations sont également prévues sur les 2 sites d'étude de la mission : TAG et Snake Pit.

1.2.2 Matériel et méthodes

Concernant la manipulation de la boîte FISH par le Nautilé, cet aspect fait l'objet d'un chapitre technique à part (cf. 2) au niveau des nouveaux outils testés sur cette mission.

- 1.2.2.1 Prélèvements avec la boîte FISH vs des remontées d'individus en PERISCOP vs des remontées d'individus avec l'aspirateur à faune du Nautilé

Des individus provenant de la même zone d'échantillonnage sont prélevés soit au moyen de la boîte FISH suivi de l'injection de RNA later, ce qui tue les crevettes immédiatement et fixe les ARN directement au fond, soit avec la Periscopette© avec des individus maintenus sous pression dans PERISCOP© jusqu'à la remontée à bord du navire, soit avec l'aspirateur à faune du Nautilé.

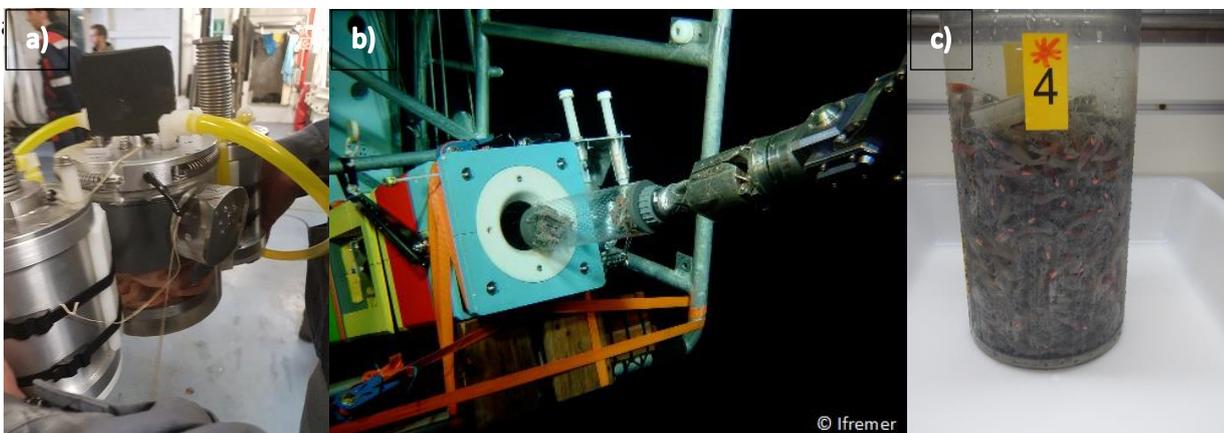


Figure 6 : différents types de remontée : a) boîte FISH, b) PERISCOP, c) bol de l'aspirateur à faune

Afin de pooler les tubes digestifs et les estomacs par 5 individus de façon à avoir plus de matériel génétique extrait, et de façon à avoir suffisamment de réplicat d'expérience, 30 individus par condition de prélèvement et par site (TAG et Snake Pit) devaient être sélectionnés. Avec des petits individus, une seule boîte FISH suffisait tandis que pour des gros individus, il fallait prévoir 2 envois de boîte FISH, le bol permettant de recueillir une vingtaine d'individus.

A leur remontée, tous les individus étaient transférés dans du RNA later, puis disséqués stérilement dans du RNA later sur glace. Les différentes pièces anatomiques de la crevette étaient ensuite conditionnées soit dans du Trizol soit dans du RNA later en cryotubes : branchiostégite1 + scaphognathite1 + exopodite1, branchiostégite2 + scaphognathite2 + exopodite2, estomacs poolés par 5, tubes digestifs poolés par 5, œufs pour femelles gravides. Le muscle était congelé à -80°C et le reste de la crevette conservé en tube Eppendorf 5 ml à sec à -80°C.

1.2.2.2 Incubations en IPOCAMP® avec différentes sources d'énergie.

Les spécimens vivants sont récoltés avec l'aspirateur à faune du Nautille connecté à la Periscopette® et remontés à la pression du fond à l'intérieur de Periscopette®.

Deux incubations différentes d'une durée de 18h à 350 bars à 10°C en IPOCAMP® sont nécessaires sur chacun des sites pour assurer la totalité des conditions prévues.

Les crevettes les plus vivaces sont sélectionnées à la sortie de PERISCOP®. Puis 3 crevettes par condition sont insérées individuellement dans des pots Nalgène de 1 L à col étroit remplis d'eau de mer et complété par les différents substrats préparés (volume total de 1120 ml) : chlorure de fer 100 µM ou thiosulfate 100 µM + soufre colloïdal ou, méthane ou hydrogène flushés dans les flacons à travers des septums et stabilisés durant 48h avant l'incubation. Du bicarbonate de sodium (750 mM final) a été ajouté comme source de carbone pour les bactéries symbiotiques.

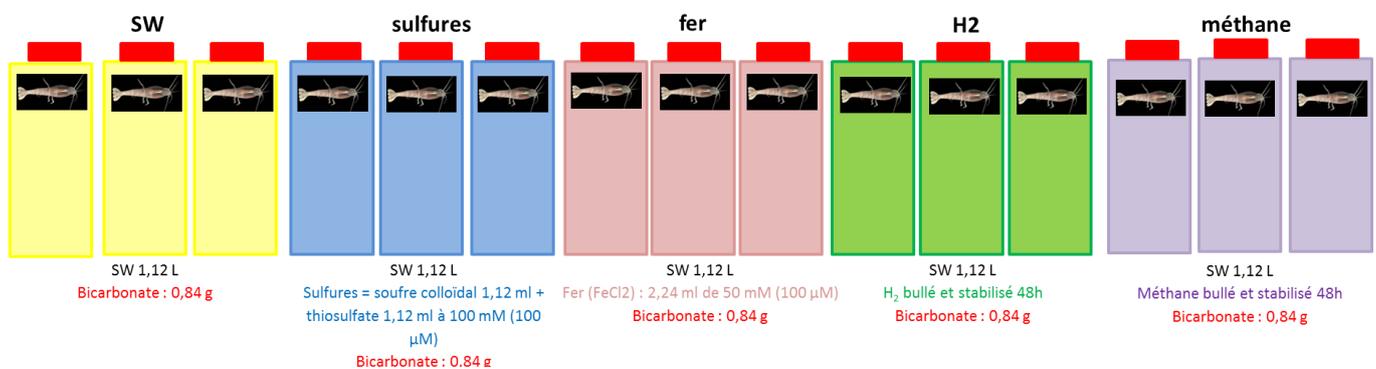


Figure 7 : schéma d'incubation des différents pots pour la métatranscriptomique

Au bout de 18h d'incubation, les spécimens sont transférés dans du RNA later, puis disséqués stérilement dans du RNA later sur glace. Les différentes pièces anatomiques de la crevette sont ensuite conditionnées dans du Trizol en cryotubes : branchiostégite1 + scaphognathite1 + exopodite1, branchiostégite2 + scaphognathite2 + exopodite2, estomac, tube digestif. Le muscle est congelé à -80°C et le reste de la crevette conservé en tube Eppendorf 5 ml à sec à -80°C.

Les conditions d'expérimentation ne permettaient pas de pooler plusieurs estomacs et plusieurs tubes digestifs ensemble. Seul un triplicata d'expérience a pu être réalisé avec 3 crevettes par type d'incubation.

Lorsque cela a été possible, les extractions d'ARN au Trizol / chloroforme ont été réalisées directement à bord.

1.2.3 Expériences réalisées

1.2.3.1 Prélèvements avec la boîte FISH vs des remontées d'individus en PERISCOP vs des remontées d'individus avec l'aspirateur à faune du Nautile

Sur le site TAG, en raison de problèmes de fonctionnement de la boîte FISH au fond, la 1^{ère} tentative a échoué, les bouteilles de fixateur ont été injectées avant de pouvoir fermer la boîte. Lors de la 2^{nde} tentative, il y avait beaucoup trop de crevettes dans le bol et le fixateur ne les a pas fixées correctement, cela s'observait à la consistance des tissus. 20 crevettes ont néanmoins été tout de même conditionnées. En raison de la météo défaillante, il n'a pas été possible de revenir sur ce site pour une 3^{ème} tentative.

C'est pourquoi il a été effectué 2 prélèvements différents sur le site Snake Pit : 1 de 30 crevettes dans les agrégats des Ruches où il y avait très peu de femelles gravides et où les crevettes étaient très petites et 1 de 15 crevettes (+ 5 conditionnées en entier) sur Elan où les crevettes étaient très grosses.

Plongée	Date plongée	site	station	instrument prélèvement	nbre	Type échantillon	Manip
PL01	04/02/2018	TAG	Active Mount	ASPI5	12	R. exoculata adulte femelle gravide	métatranscriptomique ASPI
PL01	04/02/2018	TAG	Active Mount	ASPI5	14	R. exoculata adulte femelle	métatranscriptomique ASPI
PL01	04/02/2018	TAG	Active Mount	ASPI5	4	R. exoculata adulte mâle	métatranscriptomique ASPI
PL01	04/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	10	R. exoculata adulte femelle gravide	métatranscriptomique Periscop
PL02	05/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	10	R. exoculata adulte femelle gravide	métatranscriptomique Periscop
PL04	09/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	10	R. exoculata adulte femelle gravide	métatranscriptomique Periscop
PL10	17/02/2018	TAG	Active Mount	FISH1	16	R. exoculata adulte femelle gravide	métatranscriptomique FISH
PL10	17/02/2018	TAG	Active Mount	FISH1	4	R. exoculata adulte femelle	métatranscriptomique FISH
PL13	20/02/2018	Snake Pit	Ruches	FISH	30	R. exoculata adulte femelle petite	métatranscriptomique FISH
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	29	R. exoculata adulte femelle	métatranscriptomique Periscop
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	1	R. exoculata adulte mâle	métatranscriptomique Periscop
PL16	26/02/2018	Snake Pit	Elan	ASPI4	22	R. exoculata adulte femelle gravide	métatranscriptomique ASPI
PL16	26/02/2018	Snake Pit	Elan	ASPI4	8	R. exoculata adulte femelle	métatranscriptomique ASPI
PL18	02/03/2018	Snake Pit	Elan	FISH2	15	R. exoculata adulte non sexé	métatranscriptomique FISH
PL18	02/03/2018	Snake Pit	Elan	FISH2	5	R. exoculata adulte non sexée, entière	métatranscriptomique FISH
PL18	02/03/2018	Snake Pit	Elan	FISH2	7	R. exoculata juvéniles, entière	métatranscriptomique FISH

fixé non
correctement

Sur Snake Pit, les prélèvements avec l'aspirateur à faune proviennent également d'Elan alors que les prélèvements avec PERISCOP® proviennent des ruches, c'est-à-dire au niveau des petites crevettes.

Même si le plan expérimental de départ montre une faiblesse car il n'y a pas d'échantillonnage correct avec la boîte FISH sur le site TAG, le fait d'avoir 2 échantillonnages différents de 2 endroits différents sur Snake Pit avec des analyses de chimie associée à ces sites permet de mettre en œuvre les expériences prévues.

1.2.3.2 Incubations en IPOCAMP® avec différentes sources d'énergie.

Les expériences prévues ont pu être mises en œuvre sans problèmes. Lors des incubations avec hydrogène, les crevettes étaient mortes à la sortie d'IPOCAMP®.

Plongée	Date plongée	site	station	instrument prélèvement	nbre	Type échantillon	Manip
PL09	16/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h SW Trizol
PL09	16/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h sulfures Trizol
PL09	16/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h fer Trizol
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h méthane Trizol
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h H2 Trizol
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h SW Trizol
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h sulfures Trizol
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h fer Trizol
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h méthane Trizol
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	3	R. exoculata adulte non sexé	IPO 18h H2 Trizol

1.2.3.3 Extractions d'ARN.

Quelques extractions d'ARN au Trizol® / chloroforme associées à une lyse mécanique ont également pu être menées à bord durant la mission. Les culots d'ARN étaient visibles et les ARN extraits stockés par la suite à -80°C. La suite se fera dès le retour des échantillons au laboratoire 15 jours après la fin de la mission.

- **Extraction de 24 ARN congelés à -80°C en Trizol le 04/02 au soir**

BIC2-PL01-Rimi1-LB1+SC+exo1	BIC2-PL01-Rimi1-5-TD	BIC2-PL01-Rimi1-5-EST
BIC2-PL01-Rimi6-LB1+SC+exo1	BIC2-PL01-Rimi6-10-TD	BIC2-PL01-Rimi6-10-EST
BIC2-PL01-Rimi17-LB1+SC+exo1	BIC2-PL01-Rimi17-21-TD	BIC2-PL01-Rimi17-21-EST
BIC2-PL01-Rimi22-LB1+SC+exo1	BIC2-PL01-Rimi22-26-TD	BIC2-PL01-Rimi22-26-EST
BIC2-PL01-Rimi27-LB1+SC+exo1	BIC2-PL01-Rimi27-31-TD	BIC2-PL01-Rimi27-31-EST
BIC2-PL01-Rimi32-LB1+SC+exo1	BIC2-PL01-Rimi32-36-TD	BIC2-PL01-Rimi32-36-EST
BIC2-PL01-Rimi37-LB1+SC+exo1	BIC2-PL01-Rimi37-41-TD	BIC2-PL01-Rimi37-41-EST
BIC2-PL01-Rimi42-LB1+SC+exo1	BIC2-PL01-Rimi42-46-TD	BIC2-PL01-Rimi42-46-EST

Les analyses seront réalisées en collaboration avec Johanne Aube (Ifremer, REM/EEP/LMEE), et Julie Réveillaud (INRA Montpellier).

1.3 Fonctionnement des communautés symbiotiques chez la crevette hydrothermale *Rimicaris sp.* : mise au point de FISH (hybridation *in situ* fluorescente) sur ARNm

Participants à bord : Valérie Cueff-Gauchard, Ivan Hernandez-Avila, Marie-Anne Cambon-Bonavita.

1.3.1 Objectifs

Le développement de la boîte FISH permettra aussi de développer de nouvelles approches de microscopie pour le laboratoire, associant l'identification des microorganismes présents avec le métabolisme inféré : la technique du FISH sur ARNm. Chez *Rimicaris exoculata*, les gènes transcrits cibles seront associés au métabolisme du méthane ou du soufre tels que *pmoA* ou *soxB*.

Les crevettes seront, de la même façon, fixées au fond grâce à leur prélèvement dans la boîte mais un fixateur différent, du formaldéhyde à 5%, qualité microscopie (formaldéhyde 10% méthanol free, Polysciences) sera injecté, plus adéquat pour la fixation pour le FISH.

1.3.2 Matériel et méthodes

Des crevettes adultes provenant de la même zone d'échantillonnage sont prélevées au moyen de la boîte FISH suivi de l'injection de formaldéhyde, ce qui tue les crevettes immédiatement et fixe les ARN directement au fond.

Environ 30 individus par condition de prélèvement et par site (TAG et Snake Pit) sont sélectionnés. Avec des petits individus, une seule boîte FISH suffit tandis que pour des gros individus, il faut prévoir 2 envois de boîte FISH, le bol permettant de recueillir une vingtaine d'individus.

La fixation étant d'une durée de 3h, dès l'arrivée à bord, les crevettes sont directement transférées dans de l'eau de mer stérile pour rincer les tissus puis disséquées dans de l'eau de mer pour un 2nd rinçage. Les pièces anatomiques disséquées (branchiostégite1, scaphognathite1 + exopodite1, branchiostégite2, scaphognathite2 + exopodite2, estomac, tube digestif, œufs pour femelles gravides) sont transférées dans des cryotubes contenant du PBS1X puis celui-ci est remplacé par un mélange PBS2X/éthanol 50 :50 pour un stockage à -20°C. Le muscle est congelé à -80°C et le reste de la crevette conservé en tube Eppendorf 5 ml à sec à -80°C.

1.3.3 Expériences réalisées

Plongée	Date plongée	site	station	instrument prélèvement	nbre	Type échantillon	Manip
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	FISH	7	R. exoculata adulte femelle gravide	FISH ARNm
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	FISH	8	R. exoculata adulte femelle	FISH ARNm
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Ruches	FISH2	29	R. exoculata adulte femelle	FISH ARNm
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Ruches	FISH2	1	R. exoculata adulte mâle	FISH ARNm
PL18	02/03/2018	Snake Pit	Elan	FISH1	2	R. exoculata adulte femelle gravide	FISH ARNm
PL18	02/03/2018	Snake Pit	Elan	FISH1	12	R. exoculata adulte femelle	FISH ARNm
PL18	02/03/2018	Snake Pit	Elan	FISH1	1	R. exoculata adulte mâle	FISH ARNm
PL18	02/03/2018	Snake Pit	Elan	FISH1	3	R. chacei adulte femelle	FISH ARNm

Sur le site TAG, en raison de la météo défailante, seules 15 crevettes ont été conditionnées, il n'a pas été possible d'envoyer la boîte FISH avec du formaldéhyde une 2^{nde} fois.

C'est pourquoi il a été effectué 2 prélèvements différents sur le site Snake Pit : 1 de 30 crevettes dans les agrégats des Ruches où nous n'avons pas recueilli de femelles gravides et où les crevettes étaient très petites et 1 de 14 crevettes *Rimicaris exoculata* sur Elan où les crevettes étaient très grosses et 3 *Rimicaris chacei*.

1.4 Transfert de substrat marqué en ¹⁴C chez *Rimicaris exoculata* et *Rimicaris chacei* à différents stades de vie

Participants à bord : Valérie Cueff-Gauchard, Marie-Anne Cambon-Bonavita

Aide de Bruce Shillito et Louis Amand pour récupération des crevettes dans Periscop© et incubations dans IPOCAMP©

Aide de Pierre Methou pour identifier les stades de juvéniles et des œufs.

1.4.1 Objectif

Tout comme cela avait été fait lors de la mission MomarDream-Naut en 2007 sur le site Rainbow et lors de la mission BICOSE1 sur des *Rimicaris exoculata* adultes, l'objectif est de compléter la mission BICOSE1 en étudiant le transfert vers les tissus de la crevette (ou de ses œufs) de bicarbonate marqué NaH¹⁴CO₃ après un passage par les bactéries symbiotes. Ces incorporations sont effectuées en aquariums pressurisés IPOCAMP© avec différentes sources d'énergie (eau de mer seule ; fer II, sulfures, méthane et hydrogène), sur les 2 sites d'étude TAG et Snake Pit sur les 2 espèces de crevettes à différents stades de vie :

- *Rimicaris exoculata* gravides pour voir ce qui se passe au niveau des œufs,
- *Rimicaris exoculata* juvéniles trouvées au sein des agrégats, étude de 2 stades différents,
- *Rimicaris chacei* adultes,
- *Rimicaris chacei* juvéniles (bébés des nurseries).

1.4.2 Matériel et méthodes

Les spécimens vivants sont récoltés avec l'aspirateur à faune du Nautilé connecté à la Periscopette© et remontés à la pression du fond à l'intérieur de Periscop©.

Deux incubations différentes d'une durée de 9h à 350 bars à 10°C en IPOCAMP© sont nécessaires sur chacun des sites pour assurer la totalité des conditions prévues.

Les crevettes les plus vivaces sont sélectionnées à la sortie de PERISCOP© puis sont insérées dans des pots Nalgène de 500 ml à col étroit remplis d'eau de mer et complété par les différents substrats préparés (volume total de 650 ml) : chlorure de fer 100 µM ou thiosulfate 100 µM + soufre colloïdal ou, méthane ou hydrogène

flushés dans les flacons à travers des septums et stabilisés durant 48h avant l'incubation. La source radiomarquée (bicarbonate marqué en ^{14}C) est ensuite ajoutée à raison de 0.5 mCi par pot soit 0.77 mCi/L final ou 15 μM final.

Les pots sont alors recomprimés à la pression du fond le plus rapidement possible dans IPOCAMP®.

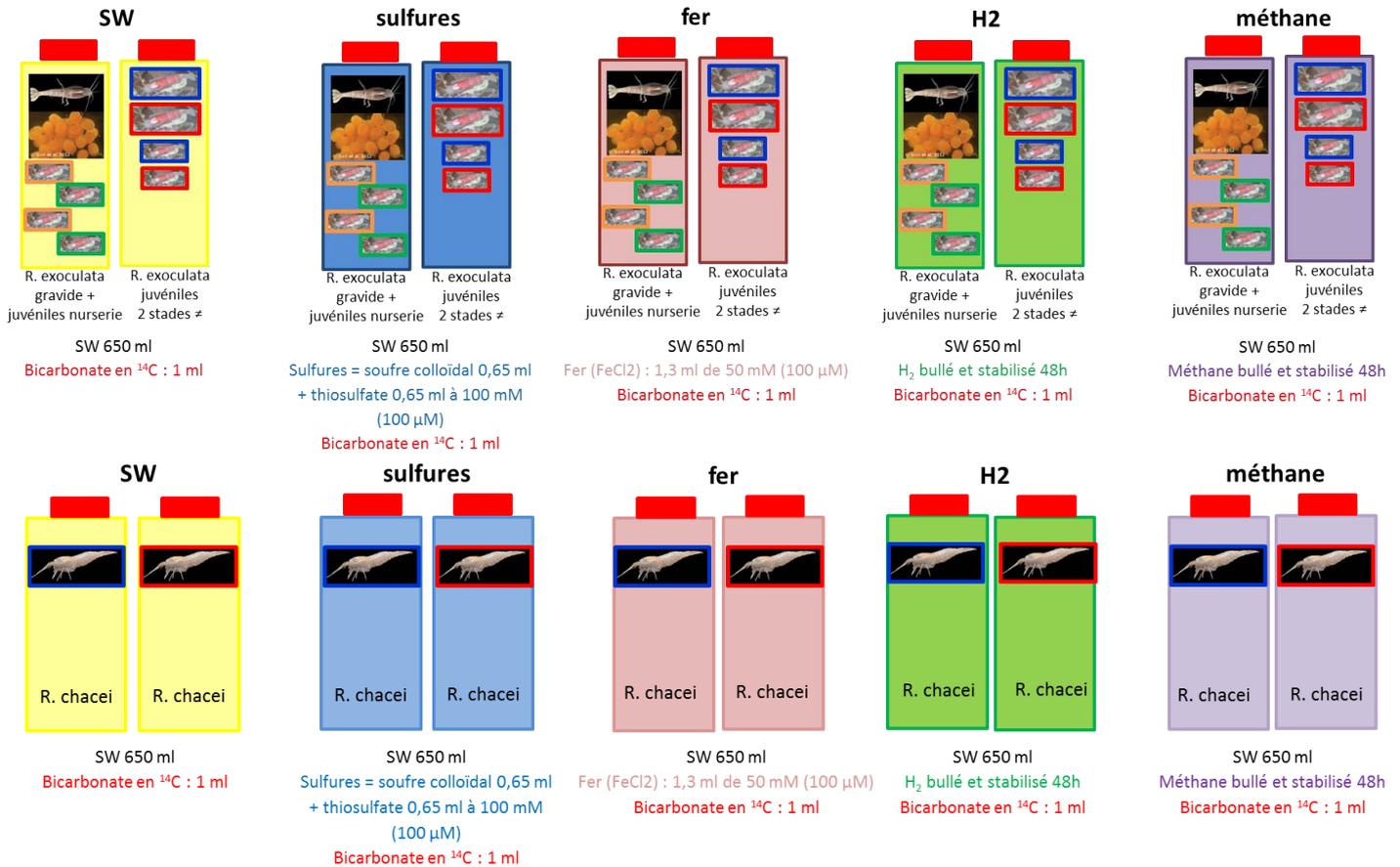


Figure 8 : schéma d'incubation des différents pots pour l'incorporation de bicarbonate radiomarqué en ^{14}C

Au bout de 9h d'incubation, les spécimens sont rincés successivement 5 min puis 2 fois 15 min dans 50 ml d'eau de mer stérile. Un aliquote du 1^{er} rinçage est conservé et les crevettes sont ensuite conditionnées selon les différents types d'analyses prévues :

1.4.2.1 Juvéniles

Ne pas disséquer, les conditionner entiers pour dissection fine en laboratoire

- La moitié des individus en **fixation glutaraldéhyde 2,5% SW7/10** (4 à 16 h) + rinçage NaN_3 au bout de 15h,
- L'autre moitié pour **congélation en cryotubes à -80°C** pour dosage de la radioactivité au scintillateur

1.4.2.2 *Rimicaris exoculata ovigère*

Œufs : séparer en 2 parties :

- Une partie pour **fixation glutaraldéhyde 2,5% SW7/10** (4 à 16 h) + rinçage NaN_3 au bout de 15h,
- L'autre partie pour **congélation en cryotubes à -80°C** pour dosage de la radioactivité au scintillateur (1 tube)

Mère porteuse : **congélation en Falcon 50 ml à -80°C**

1.4.2.3 *Rimicaris chacei* adulte

Crevette 1 : dissection

- **Fixation glutaraldéhyde 2,5% SW7/10** (4 à 16 h) + rinçage NaN₃ au bout de 15h :

Branchiostégite 1, scaphognathite 1, branchie 1, tube digestif partiel (mésentéron), 1 fragment d'hépatopancréas, une partie du muscle de l'abdomen + partie œufs éventuellement

- **Congélation en cryotubes à -80°C** pour dosage de la radioactivité au scintillateur :

Branchiostégite 2, scaphognathite 2, branchie 2, reste tube digestif, estomac, reste hépatopancréas, reste muscle abdomen + partie œufs pour femelles gravides

- **Reste crevette → en tube Eppendorf 5 ml, congélation -80°C**

Crevette 2 : congelée entière à -80°C en Falcon 50 ml

1.4.3 Expériences réalisées

Sur le site de TAG, tous les échantillonnages prévus ont pu être réalisés alors que sur Snake Pit, seules les *Rimicaris exoculata* ovigères, 1 stade de juvéniles dans les essais d'adultes et 7 *Rimicaris chacei* (sur les 10 prévues) ont pu être incubés avec du substrat radiomarké.

plongée	date	site	mont	prélèvement	spécimens	incubation
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C SW
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	4 <i>Rimicaris</i> . sp. juvénile nurserie	IPO 9h 14C SW
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C SW
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> subadulte D	IPO 9h 14C SW
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C sulfures
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	4 <i>Rimicaris</i> . sp. juvénile nurserie	IPO 9h 14C sulfures
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C sulfures
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> subadulte D	IPO 9h 14C sulfures
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C fer
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	4 <i>Rimicaris</i> . sp. juvénile nurserie	IPO 9h 14C fer
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C fer
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> subadulte D	IPO 9h 14C fer
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C H2
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	4 <i>Rimicaris</i> . sp. juvénile nurserie	IPO 9h 14C H2
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C H2
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> subadulte D	IPO 9h 14C H2
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C méthane
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	4 <i>Rimicaris</i> . sp. juvénile nurserie	IPO 9h 14C méthane
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C méthane
PL05	10/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> subadulte D	IPO 9h 14C méthane
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris chacei</i> adulte gravide	IPO 9h 14C SW
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C SW
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris chacei</i> adulte gravide	IPO 9h 14C sulfures
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	1 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C sulfures
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C fer
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C méthane
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mount	PERISCOP	2 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C H2
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C SW
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C SW
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C sulfures
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C sulfures
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C fer
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C fer
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C méthane
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C méthane
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	1 <i>Rimicaris exoculata</i> adulte femelle gravide	IPO 9h 14C H2
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	2 <i>Rimicaris exoculata</i> juvénile stade B	IPO 9h 14C H2
PL20	04/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	2 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C SW
PL20	04/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	2 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C sulfures
PL20	04/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	2 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C fer
PL20	04/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	1 <i>Rimicaris chacei</i> adulte	IPO 9h 14C H2

Même si tous les stades de vie chez *R. exoculata* ni les incubations en H₂ chez *R. chacei* n'ont pas pu être réalisés sur Snake Pit, les objectifs majeurs ont été atteints.

1.4.4 Dépouillement à terre

Le laboratoire LM2E est équipé pour faire les dosages au scintillateur. Il reste un microscope à acquérir pour réaliser les microautoradiographies. Ces analyses seront réalisées en collaboration avec Lucile Durand (Ifremer, REM/EEP/LMEE), Florence Pradillon et Pierre Methou (Ifremer, REM/EEP/LEP) et Magali Zbinden (UPMC, BOREA AMEX)

1.5 Comparaison de la diversité des symbiontes des mâles *Rimicaris exoculata* situés en périphérie des sites vs celle des mâles au sein des agrégats denses vs celle des femelles au sein des agrégats

Participants à bord : Valérie Cueff-Gauchard, Ivan Hernandez-Avila, Marie-Anne Cambon-Bonavita.

Aide de Bruce Shillito et Louis Amand pour récupération des crevettes dans Periscop©.

1.5.1 Objectifs

Lors de la campagne BICOSE1 où nous avons récoltés pour la première fois plein de crevettes femelles ovigères, nous nous sommes rendus compte que les mâles étaient situés essentiellement à la périphérie des sites actifs, et donc non exposés à la même chimie que les femelles ovigères (Hernandez-Avila, in prep). C'est pourquoi nous voulons comparer la diversité des bactéries présentes entre des mâles de la périphérie, des mâles mélangés dans les agrégats denses avec les femelles et des femelles par des nouveaux échantillonnages sur chacun des sites TAG et Snake Pit.

Les échantillons récoltés seront ensuite analysés par metabarcoding et par microscopie fluorescente *in situ*.

1.5.2 Matériel et méthodes

Des crevettes adultes provenant des différentes zones d'échantillonnage définies avec des analyses de chimie associées sont prélevées soit au moyen de la Periscopette© avec des individus maintenus sous pression dans PERISCOP© jusqu'à la remontée à bord du navire, soit avec l'aspirateur à faune du Nautille.

A la remontée, les individus sont sexés puis disséqués stérilement sous hotte à flux laminaire. Les pièces anatomiques (branchiostégite1, scaphognathite1 + exopodite1, branchiostégite2, scaphognathite2 + exopodite2, estomac, tube digestif, muscle, œufs pour femelles gravides) sont conditionnées de différentes façons selon les expérimentations prévues derrière :

- A sec à -80°C pour le metabarcoding
- Fixation de 3h dans formaldéhyde 3% puis rinçages et stockage dans mélange PBS2X/éthanol 50 :50 à -20°C pour le FISH
- Fixation de 15h dans glutaraldéhyde 2.5% puis stockage à 4°C dans azide de sodium pour microscopie électronique MEB/MET
- Dans RNA later à -80°C pour études sur ARN
- A sec à -80°C pour les muscles pour analyses isotopiques

Sur chacun des sites, 10 crevettes de chaque type sont conditionnées selon le schéma suivant :

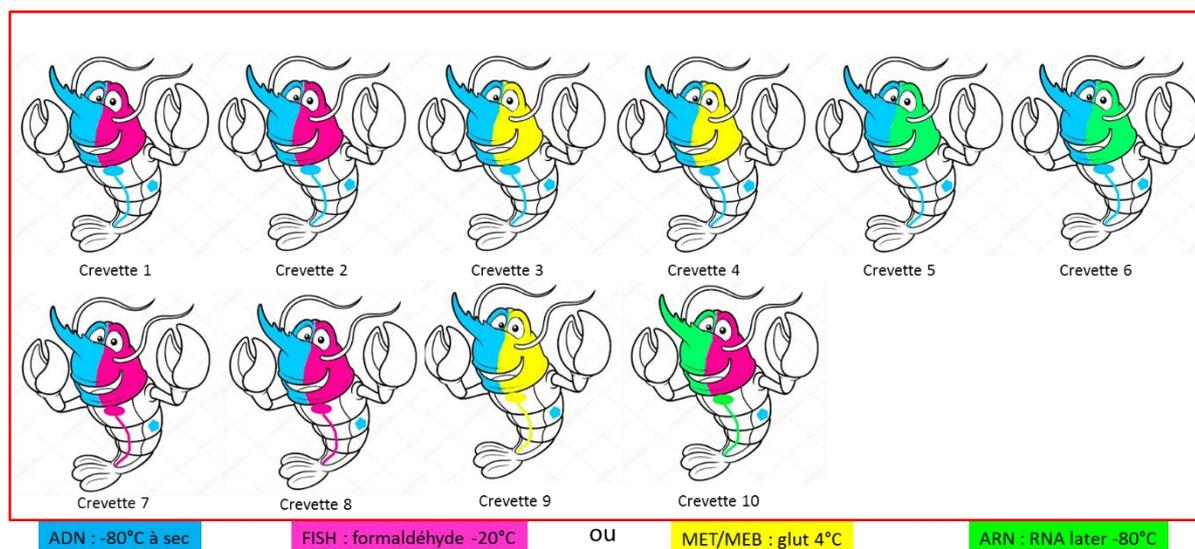


Figure 9 : schéma de dissections des individus par lot de 10

1.5.3 Expériences réalisées

Les échantillonnages réalisés ont permis de remplir les objectifs fixés avec 10 individus de chaque type sur chacun des sites TAG et Snake Pit.

Plongée	Date plongée	site	station	instrument prélèvement	nbre	Type échantillon	Manip
PL02	05/02/2018	TAG	Active Mount marqueur1	ASPI1	10	R. exoculata adulte mâle agrégat	mâles agrégats
PL06	13/02/2018	TAG	Active Mount marqueur1	PERISCOP	2	R. exoculata adulte femelle agrégat gravide	femelles agrégats
PL06	13/02/2018	TAG	Active Mount marqueur1	PERISCOP	8	R. exoculata adulte femelle agrégat	femelles agrégats
PL09	16/02/2018	TAG	Active Mount marqueur1	ASPI3	10	R. exoculata adulte mâle périphérie	mâles périphérie
PL13	20/02/2018	Snake Pit	Ruches	ASPI5	10	R. exoculata adulte femelle agrégat	femelles agrégats
PL13	20/02/2018	Snake Pit	Ruches	ASPI5	5	R. exoculata adulte mâle agrégat	mâles agrégats
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	2	R. exoculata adulte mâle agrégat	mâles agrégats
PL14	23/02/2018	Snake Pit	Elan	ASPI2	9	R. exoculata adulte mâle périphérie	mâles périphérie
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Cornet de glace	ASPI3	3	R. exoculata adulte mâle agrégat	mâles agrégats
PL15	24/02/2018	Snake Pit	arrière des Ruches	ASPI5	1	R. exoculata adulte mâle périphérie	mâles périphérie

1.5.4 Dépouillement à terre

Les extractions d'ADN seront réalisées dès le retour des échantillons au laboratoire LM2E. Les expériences complémentaires aux travaux déjà engagés par Ivan Hernandez-Avila, Simon Le Bloa et Valérie Cueff-Gauchard seront menées avec l'aide de Johanne Aube et Lucile Durand (Ifremer, REM/EEP/LMEE).

1.6 Toxicité du cuivre et du zinc chez *Rimicaris exoculata*

Participants à bord : Valérie Cueff-Gauchard, Ivan Hernandez-Avila, Magali Zbinden, Julia Machon, Bruce Shillito.

Aide de Louis Amand pour récupération des crevettes dans Periscop© et incubations dans IPOCAMP©.

1.6.1 Objectifs

Lors de la campagne BICOSE1, une expérience avait été menée sur *Rimicaris exoculata* sur le site TAG pour mesurer l'écotoxicité chez la crevette du sulfate de cuivre à différentes concentrations : 0.4 µM et 4 µM à partir d'incubations en IPOCAMP©. Suite aux remarques des reviewers de l'article paru (Auguste et al., 2016),

il est apparu intéressant de refaire l'expérience avec de plus fortes doses de sulfate de cuivre, mais aussi avec du sulfate de zinc ou en couplant les 2 substrats sur le site Snake Pit.

Les données obtenues en métatranscriptomique sur les symbiontes associés à l'hôte lors de la 1^{ère} expérience sont en cours d'analyse.

1.6.2 Matériel et méthodes

Les spécimens vivants sont récoltés avec l'aspirateur à faune du Nautille connecté à la Periscopette© et remontés à la pression du fond à l'intérieur de Periscopette©.

Deux incubations différentes d'une durée de 72h à 350 bars à 10°C en IPOCAMP© sont nécessaires pour assurer la totalité des conditions prévues.

Les crevettes les plus vivaces sont sélectionnées à la sortie de PERISCOP© et mises en attente dans BALIST© quelques heures à 10°C et 350 bars. Puis 6 crevettes par condition sont introduites dans des topettes Nalgène de 3.8 L remplies d'eau de mer et complétées par les différents substrats préparés :

- CuSO₄ 40 µM : 3.8 ml d'une solution mère à 40 mM
- CuSO₄ 100 µM : 9.5 ml d'une solution mère à 40 mM
- ZnSO₄ 100 µM : 7.6 ml d'une solution mère à 50 mM
- CuSO₄ 40 µM + ZnSO₄ 100 µM : 3.8 ml de CuSO₄ 40 mM + 7.6 ml d'une solution mère à 50 mM

L'IPOCAMP© est dépressurisé et ouvert toutes les 12h afin de renouveler le milieu d'incubation afin de renouveler la teneur en oxygène.

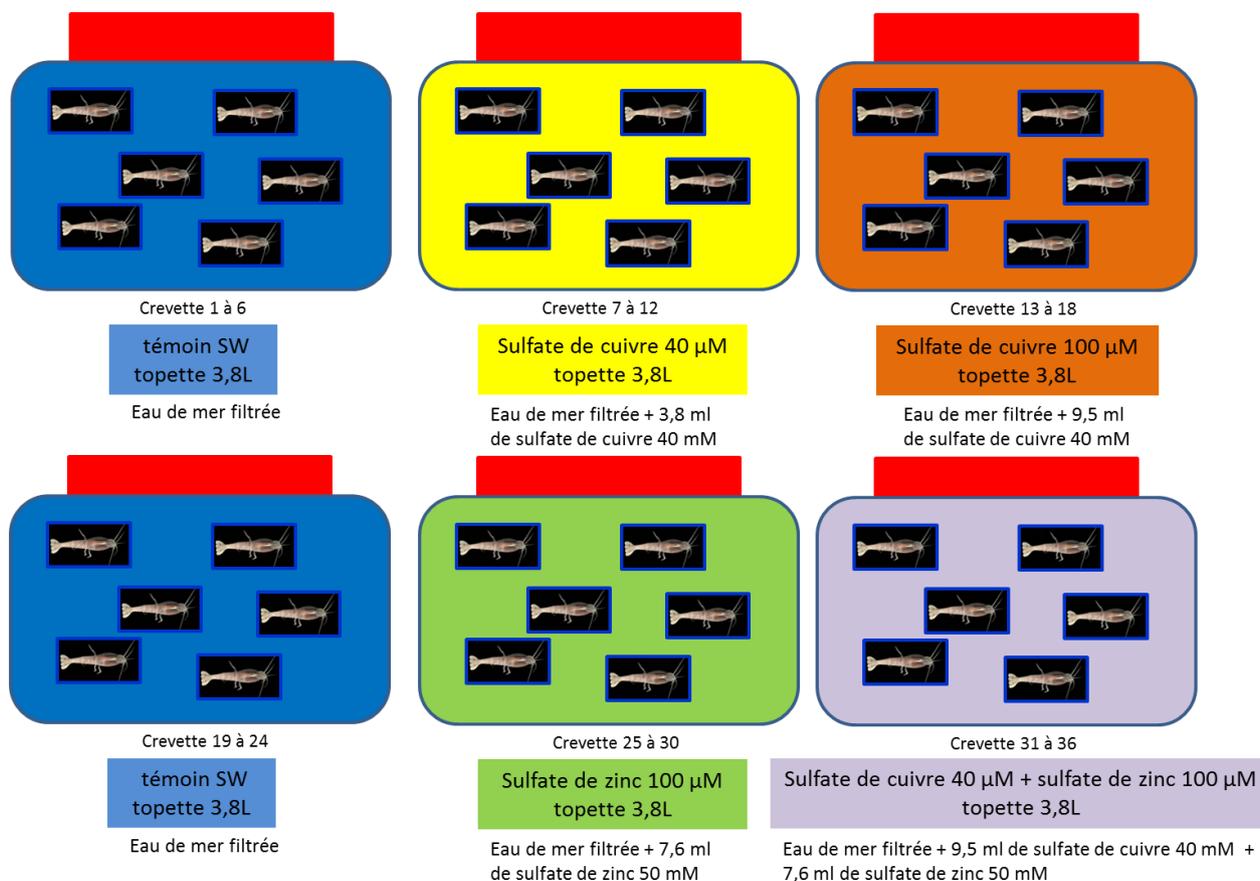


Figure 10 : schéma d'incubation des différents pots pour la toxicité cuivre et zinc

Les crevettes qui meurent sont disséquées au fur et à mesure stérilement jusqu'à la durée maximale de 72h d'incubation. Au préalable, les crevettes sont sexées et mesurées.

Au niveau des pièces anatomiques disséquées, une partie est dédiée aux études d'écotoxicité, ils sont donc congelés à sec dans de l'azote liquide avant d'être transférés à -80°C (Branchies 1, Branchies 2, ½ hépatopancréas, ½ hépatopancréas, ½ muscle, ½ muscle). L'autre partie des pièces anatomiques est dédiée aux études des symbiotes pour divers types d'expériences (métatranscriptomique, diversité ADN, FISH, MEB/MET) : branchiostégite1, scaphognathite1 + exopodite1, branchiostégite2, scaphognathite2 + exopodite2, estomac, tube digestif en respectant le schéma ci-dessous :

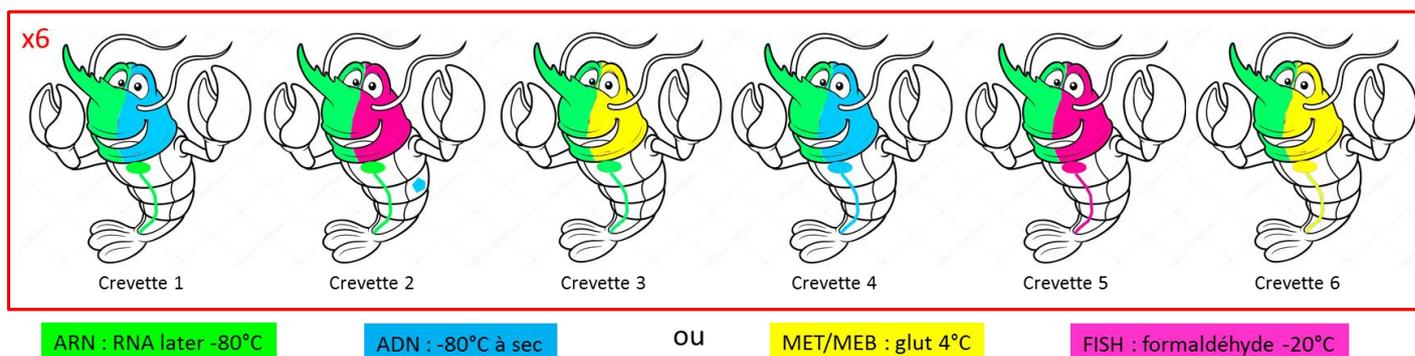


Figure 11 : schéma de dissections des individus par lot de 6

1.6.3 Expériences réalisées

Les échantillonnages réalisés ont permis de remplir les objectifs fixés avec 36 individus incubés dans 5 conditions différentes avec 1 témoin eau de mer pour chacune des 2 séries d'expérience.

Plongée	Date plongée	site	station	instrument prélèvement	nbre	Type échantillon	Manip	mortalité
PL13	20/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	6	R. exoculata adulte agrégat	écotox SW	OK 72h
PL13	20/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	6	R. exoculata adulte agrégat	écotox ZnSO4 100 µM	OK 72h
PL13	20/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	4	R. exoculata adulte agrégat	écotox ZnSO4 100 µM + CuSO4 40 µM	morte à 24h
PL13	20/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	2	R. exoculata adulte agrégat	écotox ZnSO4 100 µM + CuSO4 40 µM	morte à 36h
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	6	R. exoculata adulte agrégat	écotox SW	OK 72h
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	3	R. exoculata adulte agrégat	écotox CuSO4 40 µM	morte à 24h
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	1	R. exoculata adulte agrégat	écotox CuSO4 40 µM	morte à 36h
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	2	R. exoculata adulte agrégat	écotox CuSO4 40 µM	morte à 48h
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	4	R. exoculata adulte agrégat	écotox CuSO4 100 µM	morte à 12h
PL15	24/02/2018	Snake Pit	Ruches	PERISCOP	2	R. exoculata adulte agrégat	écotox CuSO4 100 µM	morte à 24h

1.7 Conditionnement de divers types de crevettes pour assurer des stocks au laboratoire

Participants à bord : Valérie Cueff-Gauchard, Ivan Hernandez-Avila, Marie-Anne Cambon-Bonavita.

Aide de Bruce Shillito et Louis Amand pour récupération des crevettes dans Periscop©

1.7.1 Objectifs

En fonction des expériences à mener au laboratoire, des stocks de crevettes diverses sont importants à assurer pour notamment des mises au point de protocoles. Ces crevettes comme des spécimens de *Rimicaris chacei* ou autres peuvent être directement disséquées et conditionnées selon différents protocoles ou congelées entières à -80°C pour des dissections ultérieures au laboratoire.

1.7.2 Matériel et méthodes

Des crevettes adultes provenant des différentes zones d'échantillonnage sont prélevées soit au moyen de la Periscopette© avec des individus maintenus sous pression dans PERISCOP© jusqu'à la remontée à bord du navire, soit avec l'aspirateur à faune du Nautille.

Les crevettes non utilisées rapidement par les autres scientifiques sont congelées entières sur des plateaux à -80°C puis transférées en sachets de congélation et triées par type de crevettes.

La partie « cycle de vie chez *Rimicaris exoculata* » a été traitée en majeure partie par Pierre Methou au niveau des individus disséqués (*Rimicaris exoculata* : femelles gravides, juvéniles de la nurserie et autres juvéniles). C'est pourquoi au niveau des dissections, il s'agissait de se focaliser sur d'autres espèces de crevettes telles que :

- *Chorocaris chacei*, gravides si possibles
- *Alvinocaris markensis*
- *Mirocaris fortunata*

A la remontée, les individus sont sexés puis disséqués stérilement sous hotte à flux laminaire. Les pièces anatomiques (branchiostégite1, scaphognathite1 + exopodite1, branchiostégite2, scaphognathite2 + exopodite2, estomac, tube digestif, muscle, œufs pour femelles gravides) sont conditionnées de différentes façons selon les expérimentations prévues en laboratoire :

- A sec à -80°C pour le metabarcoding
- Fixation de 3h dans formaldéhyde 3% puis rinçages et stockage dans mélange PBS2X/éthanol 50 :50 à -20°C pour le FISH
- Fixation de 15h dans glutaraldéhyde 2.5% puis stockage à 4°C dans azide de sodium pour microscopie électronique MEB/MET

Selon le nombre d'individus, il faut essayer de respecter le schéma suivant :

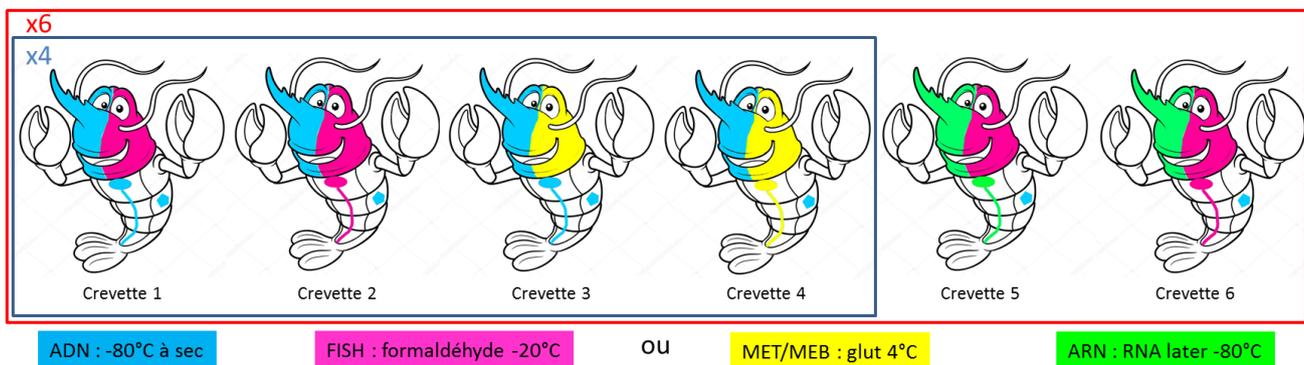


Figure 12 : schéma de dissections des crevettes "autres"

1.7.3 Stocks réalisés

Les stocks de crevettes entières ont été essentiellement réalisés sur le site TAG car beaucoup d'échantillonnages sur le site Snake Pit au niveau des bols de l'aspirateur à faune étaient dédiés aux études de population (Florence Pradillon, thèse Pierre Methou). Par ailleurs, sur Snake Pit, les différentes expériences menées ont été très condensées ce qui ne permettait pas d'assurer des stocks en parallèle dans des temps restreints, nécessaires à la bonne conduite des expériences en aval au laboratoire.

297 crevettes entières diverses ont donc été conditionnées sur le site TAG et 29 sur Snake Pit. Par ailleurs, 3 *Rimicaris chacei* adulte mâles ont été disséqués et conditionnés pour différentes expérimentations sur le site TAG.

Plongée	Date plongée	site	station	instrument prélèvement	nbre	Type échantillon	Manip
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mound BIC13	ASPI2	3	R. chacei adulte mâle	à sec -80°C / FISH
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mound BIC13	ASPI2		R. chacei adulte mâle	FISH / à sec -80°C
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mound BIC13	ASPI2		R. chacei adulte mâle	GLUT / à sec -80°C
PL02	05/02/2018	TAG	Active Mound	PERISCOP	74	R. exoculata adulte	stock entières -80°C
PL07	14/02/2018	TAG	Active Mound	ASPI4	14	R. exoculata adulte femelle gravide	stock entières -80°C
PL07	14/02/2018	TAG	Active Mound	ASPI4	9	R. exoculata adulte femelle avec gonades	stock entières -80°C
PL07	14/02/2018	TAG	Active Mound	ASPI4	35	R. exoculata adulte femelle	stock entières -80°C
PL08	15/02/2018	TAG	Active Mound	PERISCOP	37	R. exoculata adulte	stock entières -80°C
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mound	PERISCOP	60	R. exoculata adulte	stock entières -80°C
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mound marqueur5	ASPI1	7	R. exoculata adulte mâle agrégat dense	stock entières -80°C
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mound marqueur5	ASPI1	20	R. exoculata adulte femelle agrégat dense	stock entières -80°C
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mound marqueur5	ASPI2	30	R. exoculata adulte mâle agrégat dense	stock entières -80°C
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mound marqueur5	ASPI3	4	R. exoculata adulte mâle périphérie	stock entières -80°C
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mound marqueur5	ASPI4	1	R. exoculata adulte mâle périphérie	stock entières -80°C
PL11	18/02/2018	TAG	Active Mound marqueur5	ASPI4	6	R. chacei adulte petite périphérie	stock entières -80°C
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	21	R. exoculata adulte femelle	stock entières -80°C
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	3	R. exoculata adulte mâle	stock entières -80°C
PL17	01/03/2018	Snake Pit	Elan	PERISCOP	5	R. exoculata petite sub-adulte	stock entières -80°C

1.8 Bilan des objectifs atteints

Manips TAG	type prélèvement	type individus	objectif	réalisé	fait le	fait le	fait le	validé
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	5 femelles gravides R. exoculata	5	5	PL05 05/02			OK
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	10 juvéniles R. exoculata stade 3	10	10	PL05 05/02			OK
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	10 juvéniles R. exoculata stade 4	10	10	PL05 05/02			OK
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	20 juvéniles nurserie	20	20	PL05 05/02			OK
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	10 Chorocaris chacei	10	10	PL08 15/02			OK
métatranscriptomique	PERISCOP	30 adultes R. exoculata	30	30	10 PL01 04/02	10 PL02 05/02	10 PL04 09/02	OK
métatranscriptomique	ASPI	30 adultes R. exoculata	30	30	PL01 04/02			OK
métatranscriptomique	FISH	30 adultes R. exoculata	30	20	20 PL10 17/02			pas bien fixé
métatranscriptomique	PERISCOP	15 adultes R. exoculata IPOCAMP	15	15	9 PL09 16/02	6 PL11 18/02		OK
FISH ARNm	FISH	30 adultes R. exoculata	30	15	15 PL05 10/02			partiel
mâles vs femelles	ASPI/PERISCOP	10 mâles R. exoculata agrégats	10	10	PL02 05/02			OK
mâles vs femelles	ASPI/PERISCOP	10 femelles R. exoculata agrégats	10	10	PL06 13/02			OK
mâles vs femelles	ASPI/PERISCOP	10 mâles R. exoculata périphérie	10	10	PL09 16/02			OK
autres : cycle de vie, R. chacei	ASPI/PERISCOP	30 individus max	3	3				OK
stocks crevettes entières	ASPI/PERISCOP	R. exoculata : femelles, gravides, mâles		297				
			TOTAL	223	198			

Manips SNAKE PIT	type prélèvement	type individus	objectif	réalisé	fait le	fait le	fait le	validé
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	5 femelles gravides R. exoculata	5	5	PL17 01/03			OK
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	10 juvéniles R. exoculata stade 3	10	10	PL17 01/03			OK
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	10 juvéniles R. exoculata stade 4	10	0				non
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	20 juvéniles nurserie	20	0				non
radioactivité 14C IPOCAMP	PERISCOP	10 Chorocaris chacei	10	7	PL20 04/03			partiel
métatranscriptomique	PERISCOP	30 adultes R. exoculata	30	30	PL14 23/02			OK
métatranscriptomique	ASPI	30 adultes R. exoculata	30	30	PL16 26/02			OK
métatranscriptomique	FISH	30 adultes R. exoculata	30	45	30 PL13 20/02	15 PL18 02/03		OK
métatranscriptomique	PERISCOP	15 adultes R. exoculata IPOCAMP	15	15	PL14 23/02			OK
FISH ARNm	FISH	30 adultes R. exoculata	30	47	30 PL14 23/02	17 PL18 02/03		OK
mâles vs femelles	ASPI/PERISCOP	10 mâles R. exoculata agrégats	10	10	5 PL13 20/02	2 PL14 23/02	3 PL15 24/02	OK
mâles vs femelles	ASPI/PERISCOP	10 femelles R. exoculata agrégats	10	10	10 PL13 20/02			OK
mâles vs femelles	ASPI/PERISCOP	10 mâles R. exoculata périphérie	10	10	9 PL14 23/02	1 PL15 24/02		OK
toxicité cuivre	PERISCOP	18 R. exoculata adultes	18	18	18 PL15 24/02			OK
toxicité zinc / zinc+cuivre	PERISCOP	18 R. exoculata adultes	18	18	18 PL13 20/02			OK
stocks crevettes entières	ASPI/PERISCOP	R. exoculata : femelles, gravides, mâles		29				
			TOTAL	256	255			

TOTAL mission expériences	479	453	94,57%
TOTAL mission avec stocks		779	
TOTAL mission disséquées		385	

Références bibliographiques

- Auguste, M., N.C. Mestre, T.L. Rocha, C. Cardoso, V. Cueff-Gauchard, S. Le Bloa, M.A. Cambon-Bonavita, B. Shillito, M. Zbinden, J. Ravaux, and M.J. Bebianno. 2016. Development of an ecotoxicological protocol for the deep-sea fauna using the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Aquatic Toxicology*. 175:277-285.
- Corbari, L., M. Zbinden, M.-A. Cambon-Bonavita, F. Gaill, and P. Compere. 2008. Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquatic Biology*. 1:225-238.
- Cowart, D.A., L. Durand, M.A. Cambon-Bonavita, and S. Arnaud-Haond. 2017. Investigation of bacterial communities within the digestive organs of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* provide insights into holobiont geographic clustering. *Plos One*. 12.
- Durand, L., M. Roumagnac, V. Cueff-Gauchard, C. Jan, M. Guri, C. Tessier, M. Haond, P. Crassous, M. Zbinden, S. Arnaud-Haond, and M.A. Cambon-Bonavita. 2015. Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* resident gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites. *Fems Microbiology Ecology*. 91.
- Durand, L., M. Zbinden, V. Cueff-Gauchard, S. Duperron, E.G. Roussel, B. Shillito, and M.-A. Cambon-Bonavita. 2010. Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*. 71:291-303.
- Edgcomb, V.P., C. Taylor, M.G. Pachiadaki, S. Honjo, I. Engstrom, and M. Yakimov. 2016. Comparison of Niskin vs. in situ approaches for analysis of gene expression in deep Mediterranean Sea water samples. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*. 129:213-222.
- Gebruk, A.V., E.C. Southward, H. Kennedy, and A.J. Southward. 2000. Food sources, behaviour, and distribution of hydrothermal vent shrimps at the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 80:485-499.
- Guri, M., L. Durand, V. Cueff-Gauchard, M. Zbinden, P. Crassous, B. Shillito, and M.A. Cambon-Bonavita. 2012. Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Isme Journal*. 6:597-609.
- Hernandez-Avila, I., M.A. Cambon-Bonavita, and F. Pradillon. 2015. Morphology of First Zoeal Stage of Four Genera of Alvinocaridid Shrimps from Hydrothermal Vents and Cold Seeps: Implications for Ecology, Larval Biology and Phylogeny. *Plos One*. 10.
- Hugler, M., J.M. Petersen, N. Dubilier, J.F. Imhoff, and S.M. Sievert. 2011. Pathways of Carbon and Energy Metabolism of the Epibiotic Community Associated with the Deep-Sea Hydrothermal Vent Shrimp *Rimicaris exoculata*. *Plos One*. 6.
- Jan, C., J.M. Petersen, J. Werner, H. Teeling, S.X. Huang, F.O. Glockner, O.V. Golyshina, N. Dubilier, P.N. Golyshin, M. Jebbar, and M.A. Cambon-Bonavita. 2014. The gill chamber epibiosis of deep-sea shrimp *Rimicaris exoculata*: an in-depth metagenomic investigation and discovery of Zetaproteobacteria. *Environmental Microbiology*. 16:2723-2738.
- Le Bloa, S., L. Durand, V. Cueff-Gauchard, J. Le Bars, L. Taupin, C. Marteau, A. Bazire, and M.A. Cambon-Bonavita. 2017. Highlighting of quorum sensing lux genes and their expression in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* ectosymbiotic community. Possible use as biogeographic markers. *Plos One*. 12.
- Petersen, J.M., A. Ramette, C. Lott, M.-A. Cambon-Bonavita, M. Zbinden, and N. Dubilier. 2009. Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous gamma- and epsilonproteobacteria at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environmental Microbiology*.
- Polz, M.F., and C.M. Cavanaugh. 1995. Dominance of one bacterial phylotype at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:7232-7236.
- Ponsard, J., M.A. Cambon-Bonavita, M. Zbinden, G. Lepoint, A. Joassin, L. Corbari, B. Shillito, L. Durand, V. Cueff-Gauchard, and P. Compere. 2013. Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *Isme Journal*. 7:96-109.
- Sanders, J.G., R.A. Beinart, F.J. Stewart, E.F. Delong, and P.R. Girguis. 2013. Metatranscriptomics reveal differences in in situ energy and nitrogen metabolism among hydrothermal vent snail symbionts. *Isme Journal*. 7:1556-1567.
- Schmidt, C., N. Le Bris, and F. Gaill. 2008. Interactions of deep-sea vent invertebrates with their environment: The case of *Rimicaris exoculata*. *Journal of Shellfish Research*. 27:79-90.
- Segonzac, M., M. Desaintlaurent, and B. Casanova. 1993. Enigma of the trophic adaptation of the shrimp Alvinocaridae in hydrothermal areas along the mid-atlantic ridge. *Cahiers De Biologie Marine*. 34:535-571.
- Shillito, B., G. Hamel, C. Duchi, D. Cottin, J. Sarrazin, P.M. Sarradin, J. Ravaux, and F. Gaill. 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., D. Jollivet, P.-M. Sarradin, P. Rodier, F. Lallier, D. Desbruyeres, and F. Gaill. 2001. Temperature resistance of *Hesilyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker wall. *Marine Ecology Progress Series*. 216:141-149.
- Van Dover, C.L., B. Fry, J.F. Grassle, S. Humphris, and P.A. Rona. 1988. Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the mid-atlantic ridge. *Marine Biology*. 98:209-216.
- Vereshchaka, A.L., D.N. Kulagin, and A.A. Lunina. 2015. Phylogeny and New Classification of Hydrothermal Vent and Seep Shrimps of the Family Alvinocarididae (Decapoda). *Plos One*. 10.
- Williams, A.B., and P.A. Rona. 1986. Two new caridean shrimps (bresiliidae) from a hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of Crustacean Biology*. 6:446-462.

- Zbinden, M., and M.-A. Cambon-Bonavita. 2003. Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiology Ecology*. 46:23-30.
- Zbinden, M., N. Le Bris, F. Gaill, and P. Compere. 2004. Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Marine Ecology-Progress Series*. 284:237-251.
- Zbinden, M., B. Shillito, N. Le Bris, C.D. de Montlaur, E. Roussel, F. Guyot, F. Gaill, and M.-A. Cambon-Bonavita. 2008. New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 359:131-140.

2 Rapport technique sur boîte FISH

Participants à bord : Valérie Cueff-Gauchard, Ivan Hernandez-Avila, Laurent Bignon.

2.1 Présentation de l'outil

Ce nouvel outil, baptisé FISH (Fixateur *In-situ* de Substrats Homogénéisés), combine plusieurs fonctions et est actuellement adapté à sa mise en œuvre par le submersible Nautile :



- ✓ Système permettant de prélever de la faune mobile à l'intérieur d'une boîte pouvant ensuite se fermer de façon étanche ;
- ✓ Injection de différents fixateurs chimiques possibles dans la boîte venant remplacer l'eau de mer prélevée avec les animaux ;
- ✓ Mixage pour homogénéiser le fixateur et blesser les chairs animales afin de permettre une bonne imprégnation des tissus animaux tout en maintenant l'état intègre des tissus.

- ✓ Remplacement de la boîte de prélèvement en cours de plongée par une 2^{ème} boîte de prélèvement.

Au cours du développement du projet, différentes options ont été envisagées au niveau de chacune des fonctions qui ont fait l'objet de développements successifs. En effet, des essais ont été mis en œuvre par les scientifiques et développeurs pour permettre d'améliorer le prototype initial tant d'un point de vue ergonomique au niveau de sa préparation à la paillasse que dans sa manipulation au fond de la mer par le Nautile :

- sur paillasse en laboratoire au sein de EEP,
- sur la mission HERMINE (mars-avril 2017) avec le Nautile,
- à Toulon en atelier de Genavir (juillet 2017) avec le Nautile,
- sur la mission d'essais ESSNAUT17 (décembre 2017) avec le Nautile.

Le préleveur FISH est donc composé de :

- ✓ un support (Figure 13c) à poste dans le panier du Nautile équipé d'un moteur hydraulique relié d'une part facilement à la platine largable du Nautile, et d'autre part à un système d'entraînement magnétique, pour la fonction de broyeur. Ce support est par ailleurs relié en entrée au tuyau de prélèvement de l'aspirateur à faune avec son embout et en sortie aux bols de l'aspirateur à faune ;
- ✓ un bol de prélèvement démontable (Figure 13b) équipé de :
 - un couvercle rotatif qui permet l'étanchéité du bol une fois actionnée sa fermeture grâce à des ressorts entraînés par l'enlèvement d'une goupille.
 - lames de mixeur
 - des aimants reliés aux lames de mixeur qui forment un accouplement magnétique avec le support relié au moteur hydraulique pour la fonction de broyeur. Ce système d'accouplement magnétique permet d'échanger 2 bols de prélèvement en cours de plongée pour faire plusieurs prélèvements successifs dans la même plongée.
- ✓ 2 bouteilles en aluminium (Figure 13a) remplies de différents types de fixateur chimiques possibles, accolées à la boîte de prélèvement, avec un transfert complet dans le bol de prélèvement sans mélange avec l'eau de mer de prélèvement, grâce à un système de piston déclenché en action simultanée avec la fermeture du bol de prélèvement. L'injection de fixateur entraîne la mort quasi instantanée des animaux en les fixant dans leur état physiologique naturel ;
- ✓ un raccord droit qui se clipse sur le support à vide pour permettre d'utiliser directement l'aspirateur à faune de l'engin en absence de bol préleveur du FISH.
- ✓ 3 supports dont 2 aimantés pour une manipulation aisée à la paillasse et pour maintenir la boîte FISH en bonne position dans l'ascenseur de l'engin sous-marin.

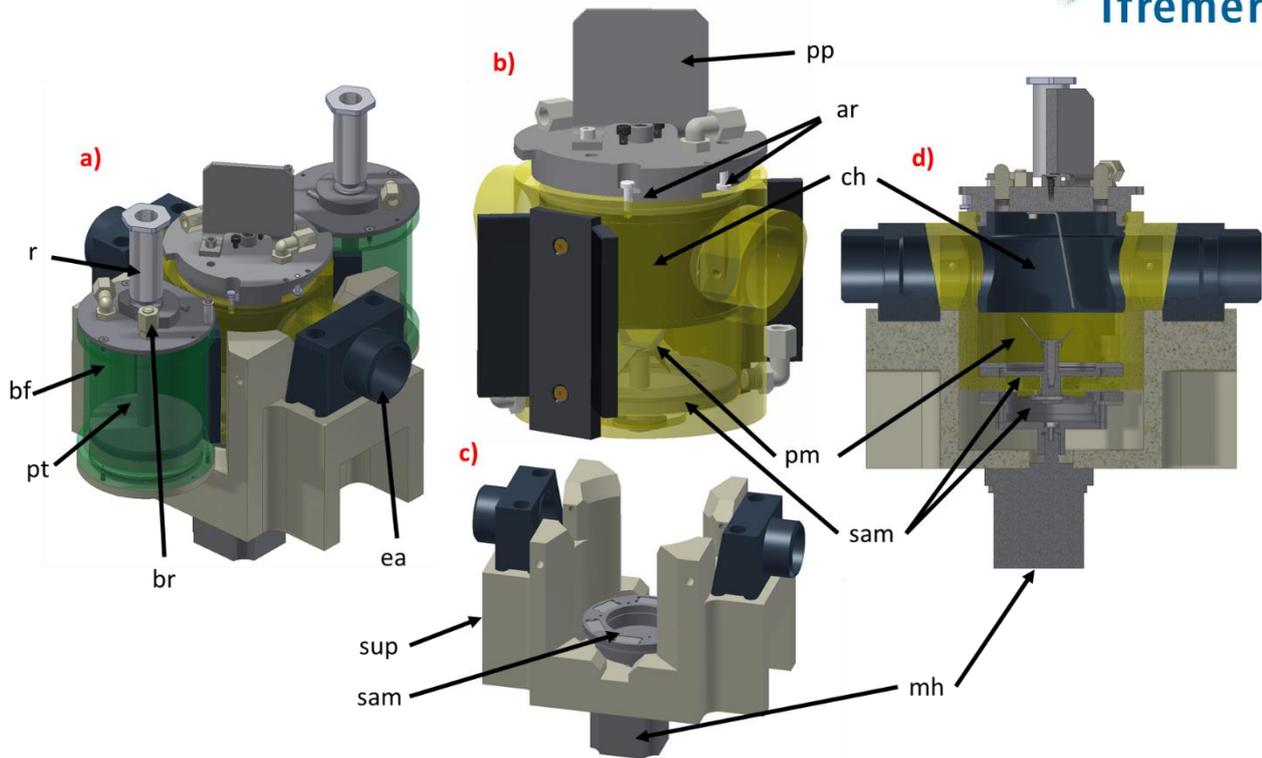


Figure 13 : plans du préleveur FISH

- a) Système complet du préleveur avec son support
- b) Bol de prélèvement
- c) Support monté dans le panier de l'engin sous-marin
- d) Coupe du bol de prélèvement monté sur son support

r : ressort, bf : bouteille de fixateur, pt : piston, br : bouchon de remplissage, ea : embout pour raccord tuyau aspirateur, pp : poignée de préhension, ar : accroches pour ressorts du couvercle, ch : chemise étanche, pm : pâles du mixeur, sam : système d'accouplement magnétique, sup : support, mh : moteur hydraulique.

2.2 Protocole de mise en œuvre par le Nautil

Avant la plongée

- 1) Placer le couvercle du bol de prélèvement dans sa position initiale (en butée, ressorts tendus) et le verrouiller avec la goupille de maintien. Dans cette position, les ouvertures du couvercle sont en face de celles de la boîte. Celle-ci est donc ouverte.
- 2) Mettre les pistons des bouteilles de fixateur en position initiale (en butée, ressort comprimé) et les verrouiller avec les goupilles de maintien dont le fil de kevlar qui les relie au couvercle du bol doit préalablement être passé autour du pivot fixe.
- 3) Remplir les bouteilles avec le fixateur chimique par les bouchons de remplissage sur les tapes supérieures.
- 4) En parallèle, installer le support dans le panier du Nautil au moyen d'équerres et relier le moteur hydraulique à la platine largable du Nautil par des « push pulls ».
- 5) Positionner l'ensemble (boîte + bouteilles) dans le support, de manière à accoupler la boîte de prélèvement avec la platine d'accouplement magnétique montée dans le support. Le préleveur est alors prêt à être utilisé. Faire attention au sens des pâles de façon à bien choisir le sens de rotation lors de l'actionnement du moteur.

Au fond

- 6) Une fois sur site, au signal du scientifique, la pompe de l'aspirateur est mise en marche. Aspirer les crevettes pendant 2 sec dans un agrégat dense où grosses Rimicaris exoculata (pas plus de 2 sec, besoin de 15 grosses crevettes). Attention à ne pas avoir un bol trop compact. La faune est alors aspirée dans le tuyau (tenu par le bras Sherpa) et se retrouve dans la boîte de prélèvement (le couvercle est muni d'une grille en sortie permettant de maintenir la faune dans la boîte).
- 7) Lorsque la boîte est pleine, le pilote du NAUTIL doit tirer sur le bout de la goupille du couvercle reliée à un flotteur (tenu par le bras Maestro) à l'horizontale (ne pas tirer la goupille à la verticale). Les ressorts

sont supposés entrainer le couvercle en rotation jusqu'à atteindre sa butée (position fermée). Si les ressorts n'entraînent pas la fermeture du couvercle et la percussion des bouteilles, donner un ¼ de tour à la poignée pour fermer manuellement la boîte (attention à ne pas forcer trop loin, position alignée avec les picots blancs)

Lors de la rotation du couvercle, les goupilles des bouteilles de fixateur (dont les bouts sont reliés au couvercle) sont déclenchées. Les ressorts des bouteilles tirent alors sur les pistons, permettant ainsi de remplacer l'eau de mer de la boîte (aspirée sous le piston) par le fixateur chimique (injecté dans la boîte).

- 8) Une fois les bouteilles vidées dans la boîte, les lames d'homogénéisation sont mises en rotation afin de permettre au fixateur de pénétrer à l'intérieur de la faune prélevée : rester à la puissance maximale pendant 15 sec
- 9) La phase de prélèvement est alors terminée, la boîte est retirée du support et rangée dans l'ascenseur dans un compartiment adapté.
- 10) Une 2^{ème} boîte de prélèvement peut alors être installée ou le raccord droit vient remplacer la boîte pour rendre l'aspirateur à faune à nouveau utilisable.
Lors de l'insertion de la 2^{ème} boîte, attention au sens d'insertion de la boîte, mettre côté grille indiqué sur boîte vers bols ASPI.

2.3 Problèmes techniques rencontrés lors de la mise en œuvre sur la mission BICOSE2

Les boîtes FISH ont pu être mises en œuvre sur 5 plongées différentes dont 3 plongées avec 2 boîtes différentes au cours de la plongée :

- PL05 le 10/02/2018 sur le site TAG (2 boîtes)
- PL10 le 17/02/2018 sur le site TAG (2 boîtes)
- PL13 le 20/02/2013 sur le site Snake Pit au niveau des Ruches (toutes petites crevettes)
- PL15 le 24/02/2018 sur le site Snake Pit au niveau des Ruches (toutes petites crevettes)
- PL18 le 02/03/2018 sur le site Snake Pit au niveau d'Elan (grosses crevettes) (2 boîtes).

Lors des 2 premières plongées, un certain nombre de problèmes ont été rencontrés, ne permettant pas forcément un conditionnement adéquat des échantillons prélevés.

2.3.1 Manipulation de la boîte, remplacement par une autre boîte de prélèvement ou par le raccord droit

Les problèmes rencontrés lors de la mise en œuvre des boîtes FISH ont principalement concerné les transferts de boîte entre elles ou leur mise dans l'ascenseur, surtout lors de la 1^{ère} plongée (plongée 05 de la mission). Le remplacement d'une boîte par le raccord droit n'a posé aucun problème, rendant l'aspirateur à faune à chaque fois fonctionnel.

PL05 le 10/02/2018 :

Boîte FISH1 avec formaldéhyde 5% :

Entre le moment de la séquence de mise en œuvre de la boîte FISH n°1 (2^{ème} boîte fabriquée avec corps en aluminium) et l'arrivée à l'ascenseur, nous nous sommes rendus compte qu'une des bouteilles de fixateur n'était plus reliée au bol de prélèvement, les colsons qui les reliaient ayant été arrachés à l'intérieur du panier. Cette bouteille de fixateur n'était donc plus reliée au bol que par les tuyaux faisant jonction pour les injections de fixateur. Au moment de la pose dans l'ascenseur, un des embouts du dessus de la boîte sur lequel était accroché le tuyau de rejet de l'eau de mer s'est arraché. Tant que le Nautille était sous l'eau, ça n'a pas posé de problème mais lors de sa sortie de l'eau, une partie de la boîte s'est donc vidée sur le pont. Néanmoins, la fixation au formaldéhyde s'étant bien passée dans le temps imparti nécessaire (3h), les animaux ont tout de

même pu être conditionnés à leur remontée. Pour pallier à ce problème, les colsons en plastique ont donc été remplacés par la suite par des colliers métalliques.

Boîte FISH2 avec RNA later :

Pour ce qui est de la mise en œuvre de la 2^{ème} boîte FISH n°2 (boîte initiale avec corps en plexiglas), suite à sa récupération dans l'ascenseur, elle a été une 1^{ère} fois insérée sans problème dans son support dans le panier du Nautille mais insérée à l'envers. En la reprenant avec le bras du Nautille pour la tourner, le bas du bol de prélèvement s'est cassé lors d'un choc, et le guide en plastique blanc accroché au bol de prélèvement et permettant de relier facilement la bouteille de fixateur pivotait du coup sur lui-même, rendant très difficile l'insertion de la boîte dans son support. Au bout de plusieurs tentatives, la boîte a finalement pu être insérée dans le support. Malheureusement, à cause des à-coups donnés lors de la manipulation, une des bouteilles de fixateur a percuté avant le prélèvement.

Cette boîte a ensuite été réparée, de la colle a été rajoutée à la vis pour refixer le guide en plastique un peu plus haut, pour sa mise en œuvre sur les plongées suivantes.

PL18 le 02/03/2018

Boîte FISH1 avec formaldéhyde 5% :

Lors de l'insertion de la boîte FISH dans son support dans le panier Nautille (2^{ème} boîte de la plongée), un des raccords situés sur le dessous d'une des bouteilles de fixateur s'est décroché (Figure 14c). Cela n'a pas gêné le reste de la manipulation, s'agissant du tuyau de sortie d'eau de mer réinjectée normalement dans la bouteille de fixateur. Il y a donc eu un peu de formaldéhyde dilué libéré dans l'environnement et dans le panier lors de la récupération sur le pont. Ce système de raccord en plastique à plusieurs parties de forme coudée est à revoir et à remplacer par des raccords en inox d'un seul tenant.

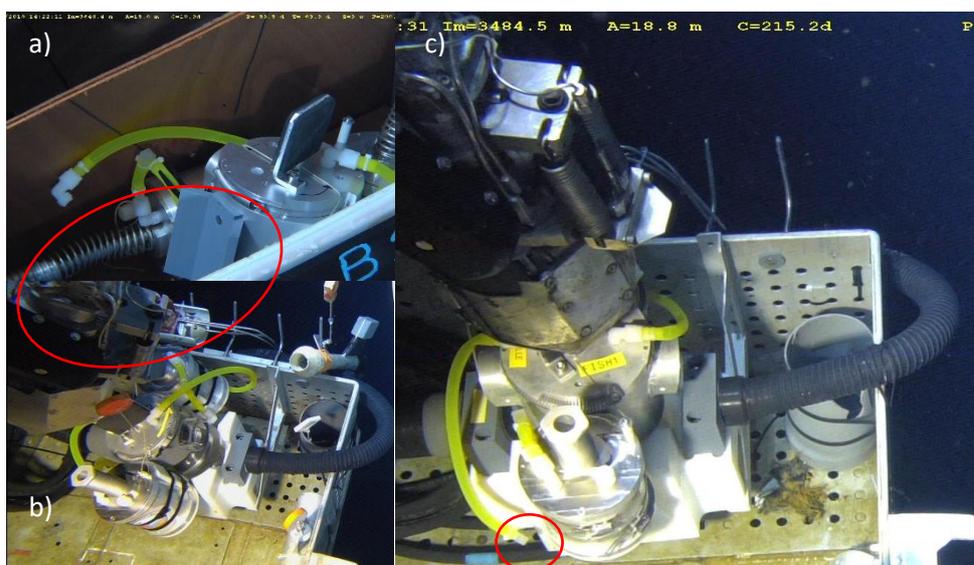


Figure 14 : positionnement de la boîte FISH dans le panier

- a) PL05 boîte 1 : bouteille de fixateur désolidarisée du bol de prélèvement
- b) PL05 boîte 2 : problèmes pour insérer boîte dans le support du panier Nautille
- c) PL18 boîte 1 : embout arraché avant le début du prélèvement

2.3.2 Fonction prélèvement de faune mobile

Il est primordial de ne pas aspirer trop longtemps dans les agrégats de crevettes afin d'avoir la juste quantité de crevettes vis-à-vis de la quantité de fixateur dans la boîte. La boîte avec le corps en aluminium ne permet pas de voir passer les crevettes à l'intérieur du bol de prélèvement, ce qui ne facilite pas les choses. C'est pourquoi lors des premières plongées, il y avait trop de crevettes dans les bols, le temps d'aspiration a ensuite été fixé à 2 secondes.

PL10 le 17/02/2018 :

Boîte FISH2 avec RNA later :

L'ensemble de la manipulation a fonctionné mais l'aspiration ayant été réalisée à 2 reprises (total de 17 sec.), le bol de prélèvement était tellement chargé de crevettes que celles-ci n'étaient pas du tout fixées à la remontée. Une vingtaine de crevettes ont néanmoins été conditionnées pour un test.

Par ailleurs, lors de toutes les plongées où la boîte FISH a été mise en œuvre, les pilotes du Nautilé ont fortement été gênés par la rigidité du tuyau utilisé pour relier l'embout de prélèvement au support de la boîte FISH dans le panier. Le tuyau n'arrêtait pas du coup de glisser sous le panier du Nautilé, qu'il fallait aller à chaque fois récupérer, faisant perdre un temps précieux lors des manipulations. Il n'a pas été possible de trouver à bord un tuyau de substitution mais il faudra veiller lors des prochaines missions à le remplacer par un tuyau plus souple, de type aspirateur ménager.

2.3.3 Fonction fermeture du couvercle

Malgré les tests sur ESSNAUT17 dont le dernier fructueux à 700 m de profondeur, sur aucune des 5 plongées de mise en œuvre sur BICOSE2 (soit 8 boîtes), la puissance des ressorts a suffi à actionner la fermeture de la boîte. Il a fallu à chaque fois que le bras du Nautilé saisisse la poignée de préhension et donne $\frac{1}{4}$ de tour pour fermer la boîte et injecter le fixateur en simultané.

Ceci n'a pas gêné le bon déroulement des opérations mais rajoute une étape supplémentaire. Ce point est donc à revoir lorsque l'on se situe à des profondeurs de 3650m.

PL05 le 10/02/2018 :

Boîte FISH2 avec RNA later :

Suite aux difficultés pour insérer cette boîte dans son support dans le panier Nautilé, le flotteur s'est détaché de la ficelle reliée à la goupille qui retient l'ouverture du couvercle. Il n'était donc pas évident de réussir à saisir une ficelle seule avec la grosse pince du Nautilé. Au bout de plusieurs tentatives, la ficelle a néanmoins pu être saisie pour ôter la goupille. Malheureusement, lors des différentes tentatives, la 2^{ème} bouteille de fixateur a elle aussi percuté avant que le bol ait pu être fermé.

PL10 le 17/02/2018

Boîte FISH1 avec RNA later :

L'orientation du bras pour tirer sur la goupille est très importante. Sur ce prélèvement, le flotteur relié à la goupille a été tiré à la verticale et non à l'horizontale, ce qui a cassé la ficelle en kevlar à la base de la goupille, rendant impossible l'extraction de la goupille à l'intérieur du couvercle. La séquence de manipulation de la boîte FISH n'ayant pas pu être terminée, ce prélèvement a donc été un échec.

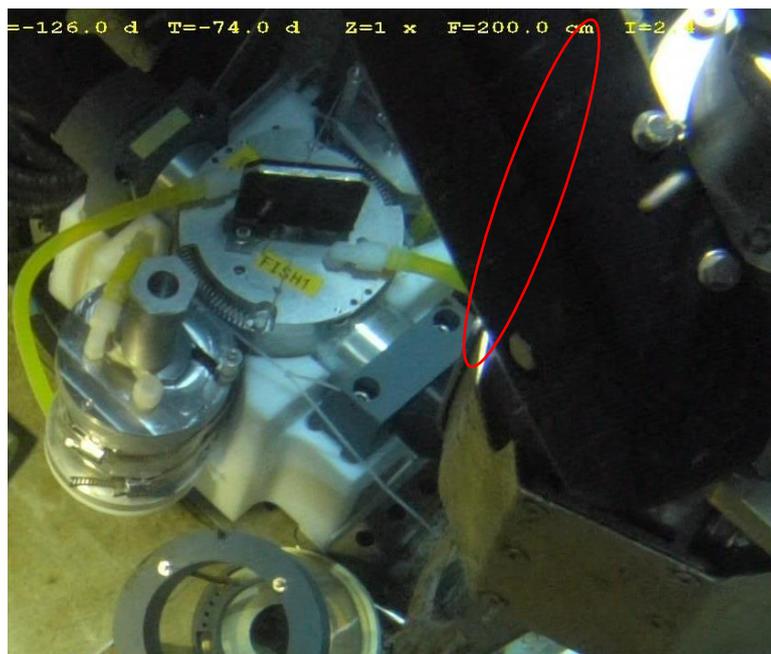


Figure 15 : goupille tirée à la verticale par le bras du Nautilic lors de la plongée 10

2.3.4 Injection du fixateur.

Si la boîte subit des chocs au cours de sa manipulation, vu que le maintien de la goupille dans les bouteilles de fixateur est très sensible, il arrive que les bouteilles soient percutées avant la fermeture de la boîte. Il est également arrivé que lorsque les bouteilles sont percutées, une bouteille se vide avant ou plus rapidement que l'autre dans le bol de prélèvement.

PL05 le 10/02/2018 :

Boîte FISH1 avec formaldéhyde 5% :

Une bouteille a percuté avant l'autre (Figure 16), ce qui génère une dilution du fixateur. Pour pallier aux problèmes de dilution éventuelle avec le formaldéhyde, il est préparé à 5% dans les bouteilles de fixateur pour une fixation prévue à 3% dans les échantillons. Cela permet d'avoir une marge concernant les phénomènes de dilution partielle avec l'eau de mer de prélèvement.

Boîte FISH2 avec RNA later :

Suite aux difficultés pour insérer cette boîte dans son support dans le panier Nautilic, les 2 bouteilles de fixateur ont été percutées accidentellement chacune à leur tour avant la fermeture de la boîte. Ce prélèvement n'a donc pas été conditionné et a été considéré comme un échec.

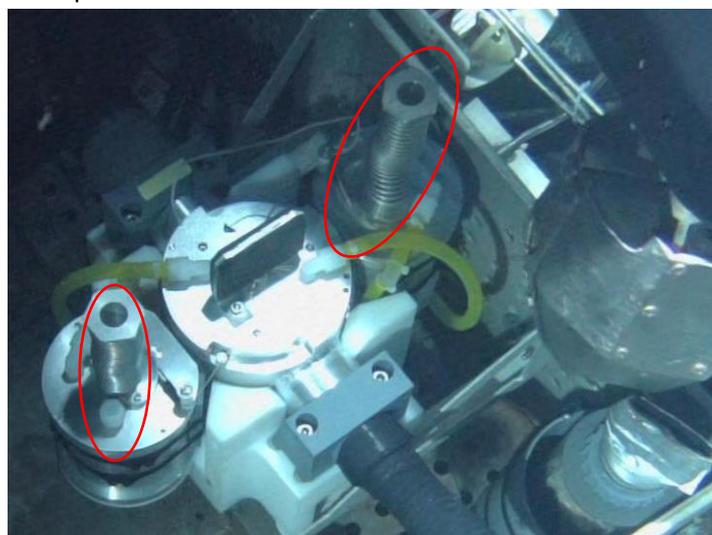


Figure 16 : visualisation d'un ressort plus détendu que l'autre lors de la plongée 05, boîte FISH1

PL18 le 02/03/2018 :

Boîte FISH1 avec formaldéhyde 5% :

Même problème rencontré que lors de la plongée 5 avec la boîte FISH1 mais dilution partielle maîtrisée par une concentration initiale en formaldéhyde plus importante que celle de la fixation prévue.

2.3.5 Fonction de broyage.

Lors de la campagne d'essais ESSNAUT17, les différents tests avaient conduit à abaisser la puissance de la centrale hydraulique du Nautil à 50 bars et à fixer à 15 sec la durée de broyage nécessaire. A 90 bars, les aimants décrochaient et s'entrechoquaient, ne permettant pas l'entraînement magnétique de la pâle de mixeur. A 2700m et 12°C, la viscosité de la Morlina 10 est de 47 cSt.

Lors des premières mises en œuvre sur BICOSE2 (PL05), nous nous sommes donc fixés sur 15 sec de broyage à 50 bars de pression hydraulique mais aucune crevette n'avait été blessée en apparence. Etant donné que les plongées avaient lieu à une profondeur de 3650m avec une eau à 2°C, la viscosité de l'huile hydraulique du sous-marin se retrouve donc fortement modifiée. C'est pourquoi les expériences suivantes ont été réalisées à la puissance initiale de la centrale à 90 bars.

Aucune crevette n'est remontée blessée en apparence sur toutes les boîtes FISH prélevées. Il est difficile de conclure si la pâle du broyeur a tourné mais au ralenti, permettant néanmoins une bonne homogénéisation du fixateur au sein des crevettes ou si ça n'a pas tourné du tout. Néanmoins cette étape n'a pas été limitante pour la validation des expériences menées. En effet, au vu de la consistance des tissus à l'extérieur et à l'intérieur des animaux, le fait de blesser les chairs animales après l'injection du fixateur n'est pas indispensable pour permettre une bonne fixation des tissus.

2.3.6 Transfert de la boîte de prélèvement dans l'ascenseur

Suite aux essais sur ESSNAUT17, il avait été convenu de préparer 2 supports assez hauts et aimantés pour faciliter l'implantation de la boîte FISH dans les ascenseurs. Au cours de BICOSE2, après réflexion, ces supports n'ont pas été utilisés. Seul le support de pailleasse de faible hauteur a été utilisé avec des Colsons cassables soit dans l'ascenseur soit dans le panier Nautil pour y fixer en attente la 2^{ème} boîte FISH à envoyer au cours d'une même plongée. Pour positionner la boîte FISH dans l'ascenseur une fois prélevée, des cases avec des cloisons en bois ont été installées de façon à ce que la boîte FISH reste à la verticale et ne puisse pas basculer à l'horizontale.

Les nouveaux supports fabriqués ont donc juste servi de supports de pailleasse.

2.4 Bilan des prélèvements

Après des échecs sur les premières mises en œuvre liées à des erreurs de manipulation ou à de la malchance, en particulier sur le site TAG, les prélèvements suivants se sont globalement bien passés même si la fonction de blessure des chairs animales pour améliorer l'imprégnation des tissus n'a pas fonctionné.

Certains points seront à revoir, notamment les raccords coudés sur lesquels sont branchés les tuyaux qui servent à relier les bouteilles de fixateur au bol de prélèvement. Le système de fermeture avec la puissance des ressorts sera également à reprendre.

La 2^{ème} boîte fabriquée dont le bol est fabriqué en aluminium ne facilite pas la visualisation des crevettes prélevées même si elle est plus solide. De plus, elle s'est très rapidement corrodée, notamment au niveau de la platine reliée aux aimants dans le fond de la boîte. A l'avenir, si un budget le permettait, il faudrait refaire toutes les pièces de la boîte en titane (bol préleveur, bouteilles de fixateur, couvercle, pistons).

Il faudrait aussi trouver un système qui permettrait de vérifier que la pâle de broyage tourne bel et bien.

Après chaque plongée, le démontage et nettoyage complet de toutes les pièces, pistons des bouteilles de fixateur y compris, est indispensable pour enlever toutes les petites particules qui sont aspirées avec les crevettes et qui sont très corrosives de même que les fixateurs utilisés.

Plongée	Boîte	Problèmes rencontrés	Bilan prélèvement
PL05 10/02	FISH1	Une bouteille a percuté avant l'autre. Une bouteille de fixateur s'est décrochée du bol de prélèvement en raison de colsons arrachés avant son transfert dans l'ascenseur, ce qui a entraîné la casse d'un embout reliant le bol à la bouteille de fixateur par un tuyau. Pas de broyage apparent.	OK, 15 <i>R. exoculata</i> conditionnées
PL05 10/02	FISH2	Bas du bol préleveur cassé rendant difficile l'insertion de la boîte dans son support installé dans le panier Nautile. Au cours de la manœuvre, déclenchement accidentel d'une des bouteilles de fixateur et arrachement du flotteur rendant difficile l'extraction de la goupille pour la fermeture de la boîte. Au cours des tentatives de fermeture du bol, déclenchement accidentel de la 2 ^{ème} bouteille de fixateur. Donc ensemble du fixateur injecté avant fermeture de la boîte FISH. Pas de broyage apparent.	Échec, crevettes néanmoins partiellement fixées mais non conditionnées
PL10	FISH2	Séquence de mise en œuvre de la boîte FISH OK mais trop de crevettes prélevées, bol de prélèvement archi rempli ayant rendu la fixation des individus en apparence infructueuse. Pas de broyage apparent.	Echec de la fixation des crevettes, 20 <i>R. exoculata</i> néanmoins conditionnées pour tests
PL10	FISH1	Flotteur arraché avec ficelle à la base de la goupille lors de la fermeture du bol de prélèvement donc impossibilité de fermer le bol de prélèvement	Echec
PL13	FISH2	Séquence de mise en œuvre de la boîte FISH OK Pas de broyage apparent.	OK, conditionnement de 30 <i>R. exoculata</i> petites.
PL15	FISH2	Séquence de mise en œuvre de la boîte FISH OK Pas de broyage apparent.	Conditionnement de 30 <i>R. exoculata</i> petites.
PL18	FISH2	Séquence de mise en œuvre de la boîte FISH OK, un embout relié à un tuyau décroché mais sans conséquence sur injection du fixateur. Pas de broyage apparent.	OK, conditionnement de 20 <i>R. exoculata</i> grosses.
PL18	FISH1	Une bouteille a percuté avant l'autre. Pas de broyage apparent.	OK, conditionnement de 14 <i>R. exoculata</i> grosses + 3 <i>R. chacei</i> .

Une adaptation pour son utilisation avec le submersible Rov Victor6000 est à prévoir en prévision de la mission Chubacarc prévue courant 2019.