

Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement d'Ile de France (ED N°129)

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paris 6
en Océanologie Biologique et Environnement Marin

Sébastien DUPERRON

**Symbioses bactériennes de bivalves mytilidés associés aux
sources de fluides en domaine océanique profond :
diversité, rôle nutritionnel et influence de l'environnement**

Soutenue le 10 novembre 2005

Jury :

Mme Myriam SIBUET, Conseillère Scientifique et Technologique, Ifremer (Brest)

Directrice de thèse

Mme Nicole DUBILIER, Associate Researcher, MPI MM (Brême, Allemagne)

Directrice de thèse

Mme Aline FIALA-MEDIONI, Professeur, Université Paris 6

Mme Françoise GAILL, Directeur de Recherche, CNRS, Paris

Mme Antje BOETIUS, Professeur, International University of Bremen (Allemagne)

M. Thierry NADALIG, Maître de Conférences, Université de Strasbourg

Cette thèse a été soutenue par une bourse co-financée par Ifremer Brest et l'Institut Max Planck de Microbiologie Marine de Brême.

This PhD was supported by a grant funded by the Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, and Ifremer Brest.

Merci aux membres du jury de me faire l'honneur d'examiner ce travail. Merci à Aline Fiala-Médioni, à Antje Boetius, à Françoise Gaill, à Thierry Nadalig,

Thanks to Nicole Dubilier, my supervisor, who helped me all along the way with her friendly attitude, her confidence, her comments about experiments and interpretations, her immense knowledge of symbiosis and microbiology, and so many other things. I learnt so much in these three years. I count myself lucky for being your student. Thanks also for your involvement in the Max Planck Research School, and the opportunities I had to both learn and teach.

Merci à Myriam Sibuet, ma directrice de thèse. Merci d'avoir proposé ce sujet, et de m'avoir supposé capable de le mener à bien. Merci pour ton soutien tout au long de ces trois ans, pour ton enthousiasme, pour avoir partagé un peu de tes immenses connaissances, et pour avoir toujours répondu si rapidement à mes demandes malgré tes responsabilités. J'ai beaucoup de chance de t'avoir pour directrice de thèse.

I would like to thank the people from the MPI for the wonderful 'almost two years' I spent in Bremen. Thanks to Rudi Amman, Bo Jörgensen and Fritz Widdel for welcoming me in this institute, and for the support they offer to young scientists. It was a great honor to be part of the MPI.

Some MPI scientists I am really indebted to are Barbara MacGregor, the RNA wizard who taught me the few tricks I know about RNA manipulation, and Marcel Kuypers who did help me so much with lipid analysis. This work would have been impossible without assistance from the talented MPI technicians, especially Silke Wetzels, Jörg Wulf and Gabi Klockgether.

I am not forgetting the students: Claudia (thanks for everything), Anna who taught me FISH and the use of a confocal microscope, Niculina for her help with slot blot, Falk for teaching me ARB, my roommate for 1 year Maren I thank for everything, Caroline, Chris who, among so many other things, prevented me from sleeping in the snow when I first arrived to Bremen, the young parents Frank and Annelie, Michi and Christian the Linux mollahs, Cecilia, Sekar, Kousuke, Tina, Claudia, and all those guys with whom I shared the office.

I also thank the French-speaking community (so many incredibly good badminton players!), Flo, Karine, Julie, Afhsin (good luck in Abu Dhabi), Patricia (don't worry, you're on your

way to french citizenship ;-) and Arash who was often trapped in our conversations. Thanks to Anna, the German teacher: I will remember that 'Butter' is feminine for the next 'Frühstück'. Merci à Thierry pour son amitié, son aide et son soutien.

You all made this stay in Bremen a happy time for me and a wonderful experience.

Merci à tous les personnels des laboratoires EEP et LMEE d'Ifremer pour leur soutien et leur aide. A Joël Quérellou pour m'avoir accueilli au sein du LMEE pour la réalisation de ces travaux. Merci à Thierry Nadalig qui a tant contribué à l'émergence de ce projet de thèse, et qui a préparé le terrain lors de la mission Biozaire 2. Merci à Daniel Desbruyères et à Karine Olu pour plein de choses, et pour avoir pris le temps de corriger l'introduction de cette thèse. Merci à Jean Claude Caprais, entre autres pour le travail fourni sur Biozaire. Merci à Nadine Le Bris, à Marie-Anne Cambon Bonavita pour leur gentillesse et les discussions scientifiques ou non. Merci à Valérie Cueff-Gauchard et à Françoise Lesongeur pour leur aide.

Merci à Franck Rosazza et Xavier Placaud, les pilotes du Nautilus qui m'ont conduit au fond de la Méditerranée (et qui m'en ont ramené !), ainsi qu'aux personnes embarquées sur Nautinil sous la houlette de Jean-Paul Foucher.

Merci aux compagnons de voyage, Alexis, Erwan, Séverine, Floriane, Sophie, Adeline, Cristophe, Lénaïk...

Merci à vous tous qui avez fait de ce séjour à Ifremer une si belle expérience.

Thanks to Chuck Fisher and Bob Carney for inviting me to the the 'Deep Seeps' Cruise, and to the people with whom I shared these weeks. Thanks to Colleen Cavanaugh.

Merci aux amis, Fred, Steff, Ninie, Nico, Philoo, Yannick, Ariane, Ben, Guiom

Immense merci à ma famille sans qui je n'aurais jamais rien fait.

Et à Cécile, toujours

Table des matières

Introduction	11
Chapitre I - Contexte général de l'étude.....	15
1 - Qu'est ce que la symbiose ?.....	15
1.1 - Bref historique et définition	15
1.2 - Le B à BA du 'vivre ensemble' et vocabulaire.....	15
1.3 –La symbiose comme facteur d'adaptation, rôle des microorganismes symbiotiques.....	16
1.3.1 – Symbioses fixatrices de carbone inorganique par photosynthèse	16
1.3.2 – Symbioses dans le tube digestif	17
1.3.3 – Rôle des symbiontes dans l'éthologie et le cycle de vie des métazoaires....	17
1.4 - La symbiose comme facteur d'évolution.....	18
1.4.1 – Quelques transformations phénotypiques liées à la symbiose.....	19
1.4.2 - Transformations génétiques liées à la symbiose.....	20
1.5 – Importance écologique et évolutive de la symbiose.....	20
2 - Les écosystèmes océaniques profonds à base chimiosynthétique	22
2.1 - L'océan profond.....	22
2.2 - Découverte et originalité des écosystèmes à base chimiosynthétique	23
2.3 – Sources de fluides froids	23
2.3.1 – Origines du méthane et hydrates de gaz.....	25
2.3.2 – Fluides et édifices.....	26
2.4 - Sources hydrothermales	28
2.4.1 – Origine du phénomène hydrothermal.....	29
2.4.2 – Fluides et édifices.....	29
2.5 - Autres écosystèmes à base chimiosynthétique	30
2.6 - Méthodes de recherche et localisation des sites de fluides froids et chauds.....	30
2.7 - Ecosystèmes associés.....	30
2.7.1 - Le compartiment microbien, acteurs et cycles.....	30
2.7.1.1 - Cycle du carbone.....	33
2.7.1.1.1 – Méthanogenèse et méthanotrophie.....	33
2.7.1.1.2 – Production primaire.....	33
2.7.1.1.3 - Carbone organique	34
2.7.1.2 - Cycle du soufre	34
2.7.1.3 - Cycle des métaux	35
2.7.1.4 – Cycle de l'azote.....	35
2.7.1.5 - Hydrogène.....	36
2.7.2 – Eucaryotes unicellulaires et métazoaires.....	37
2.7.2.1 – Particularités physico-chimiques des environnements abritant des écosystèmes à base chimiosynthétique	37
2.7.2.2 – Diversité, abondance et distribution des communautés de métazoaires	38
Chapitre II – Etat de l'art et cadre de l'étude	41
1 – Découverte des métazoaires associés à des bactéries symbiotiques dans les environnements de fluides et questions.....	41
2 – Quelques exemples d'associations symbiotiques.....	46
2.1 - Symbioses extracellulaires ou épibioses.....	46
2.1.1 - <i>Alvinella pompejana</i> (Annelida : Polychaeta : Alvinellidae), le ver de Pompeii.....	46

2.1.2 – <i>Rimicaris exoculata</i> (Arthropoda : Alvinocaridae).....	47
2.2 - Symbioses intracellulaires	47
2.2.1 – <i>Inanidrilus</i> et <i>Olavius</i> (Annelida : Oligocheata).....	47
2.2.2 – Vestimentifères et pogonophores (Annelida : Siboglinidae).....	48
2.2.3 – <i>Alviniconcha</i> et <i>Ifremeria</i> (Mollusca : Gastropoda : Provannidae).....	49
2.2.4 - Bivalves.....	50
2.2.4.1 - Thyasiridae.....	50
2.2.4.2 - Lucinidae.....	51
2.2.4.3 - Solemyidae.....	52
2.2.4.4 - Vesicomidae.....	53
3 - Les mytilidés symbiotiques.....	54
3.1 – Taxonomie et distribution des mytilidés symbiotiques.....	54
3.2 – Symbioses bactériennes des mytilidés	57
3.2.1 - Structures	57
3.2.2 - Symbioses sulfoxydantes	57
3.2.3 - Symbioses méthanotrophes.....	58
3.2.4 - La double symbiose	58
3.2.5 - Autres associations biologiques, parasitisme.....	59
3.3 - Reproduction.....	60
3.3.1 – Reproduction des mytilidés.....	60
3.3.2 – Transmission des symbiotes d’une génération à la suivante.....	60
3.4 - Evolution.....	61
3.4.1 – Evolution dans le genre <i>Bathymodiolus</i>	61
3.4.2 – Evolution des bactéries symbiotiques méthanotrophes et sulfoxydantes.....	62
3.5 – Ecologie des mytilidés symbiotiques	62
3.5.1 – Adaptations à la toxicité des fluides.....	63
3.5.2 – L’environnement chimique et son influence sur la nutrition symbiotique...	63

Chapitre III – Caractérisation qualitative et quantitative des symbioses de mytilidés: objectifs, approches méthodologiques et résultats 67

1 – Objectifs généraux de l’étude.....	67
2 – Stratégie et techniques.....	67
2.1 – Stratégie d’échantillonnage et d’étude	67
2.2 – Origine des échantillons et campagnes	69
2.3 – Techniques mises en oeuvre.....	69
2.3.1 – Caractérisation de la diversité par séquençage de l’ARN ribosomique 16S	71
2.3.2 – Techniques d’hybridation.....	73
2.3.3 – Analyses isotopiques sur tissus et biomarqueurs	74
3 - Résultats.....	76
3.1 - Les deux espèces de <i>Bathymodiolus</i> peuplant les sites hydrothermaux de la ride Médio Atlantique abritent-ils les mêmes bactéries symbiotiques, et leur abondance relative est elle influencée par la chimie des fluides ?	76
Article 'A dual symbiosis shared by two mussel species, <i>Bathymodiolus azoricus</i> and <i>B. puteoserpentis</i> (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge’	76
3.2 – Quelles bactéries sont associées à <i>Bathymodiolus</i> sp., une espèce de mytilidé associée aux sites de fluides froids de la marge du Gabon, et peut on mettre en évidence une réponse nutritionnelle ‘intrasite’ liée aux paramètres chimiques mesurées lors de la collecte ?	101

Article 'Dual symbiosis in a <i>Bathymodiolus</i> mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (South East Atlantic) : 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbiontes in the gills	103
3.3 – Quelles informations peut on tirer de l'étude comparative de la diversité et du rôle nutritionnel des bactéries associées à <i>Bathymodiolus heckeræ</i> , <i>B. brooksii</i> et <i>B. childressii</i> , trois mytilidés peuplant les sites de fluides froids du Golfe du Mexique ?	110
3.3.1 - Article 'Diversity, relative abundance and metabolic capabilities of bacterial endosymbionts in three <i>Bathymodiolus</i> mussels (Bivalvia : Mytilidae) from cold seeps in the Gulf of Mexico'	110
3.3.2 – Travaux complémentaires : développement d'une méthode visant à utiliser l'ARNr 16S comme biomarqueur chez les mytilidés associés à des bactéries symbiotiques.....	154
3.4 – <i>Idas</i> sp., mytilidé de petite taille des pockmarks de l'est de la Méditerranée : quelles bactéries sont associées à ce proche parent des <i>Bathymodiolus</i> ?	167
Article 'Coexistence of thiotrophic, methanotrophic, methylotrophic and CFB bacteria as gill endosymbionts in <i>Idas</i> sp. (Bivalvia: Mytilidae), a mussel from a pockmark area in the eastern Mediterranean'	169

Chapitre IV - Discussion générale des résultats obtenus, conclusion et perspectives sur l'étude des symbioses 193

1 - Diversité et biogéographie des bactéries symbiotiques des mytilidés	193
1.1 - Diversité des bactéries symbiotiques, découverte de nouveaux groupes.....	194
1.2 – Nouvelles données sur la biogéographie et l'évolution des symbioses	196
2 – Ecologie de la symbiose chez les mytilidés	197
2.1 – Potentiel métabolique des symbiontes	197
2.2 – Variabilité des abondances bactériennes et caractéristiques de l'environnement	197
2.3 – Rôle nutritionnel des symbiontes	199
3 – Conclusion et perspectives sur l'étude des symbioses	200

Bibliographie..... 201

Table of contents

Introduction	11
Chapter I – General background of the study.....	15
1 – What is symbiosis ?.....	15
1.1 - Brief history and definitions	15
1.2 – The basics of ‘living together’ and vocabulary.....	15
1.3 – Symbiosis as an adaptative factor	16
1.3.1 – Photosynthetic carbon-fixing symbioses.....	16
1.3.2 – Symbioses in the gut	17
1.3.3 – Role of symbionts in the ethology and life cycle of metazoans.....	17
1.4 – Symbiosis in evolution	18
1.4.1 – Some phenotypic transformations associated with symbiosis	19
1.4.2 – Some genetic transformations associated with symbiosis.....	20
1.5 – Ecological and evolutionary significance of symbiosis	20
2 – Chemosynthesis-based ecosystems in the deep ocean	22
2.1 – The deep ocean.....	22
2.2 – Discovery and originality of chemosynthesis-based ecosystems.....	23
2.3 – Cold seeps	23
2.3.1 – Origins of methane and gas hydrates	25
2.3.2 – Fluids and edifices.....	26
2.4 – Hydrothermal vents	28
2.4.1 – Origin of the hydrothermal phenomenon	29
2.4.2 – Fluids and edifices.....	29
2.5 – Other chemosynthesis-based ecosystems.....	30
2.6 – Methods for the search of hydrothermal vents and cold seeps	30
2.7 – Associated ecosystems	30
2.7.1 – The microbial compartment, actors and cycles	30
2.7.1.1 – Carbon cycle.....	33
2.7.1.1.1 – Methanogenesis and methanotrophy.....	33
2.7.1.1.2 – Primary production.....	33
2.7.1.1.3 – Organic carbon	34
2.7.1.2 – Sulfur cycle	34
2.7.1.3 – Iron cycle.....	35
2.7.1.4 – Nitrogen cycle	35
2.7.1.5 - Hydrogen.....	36
2.7.2 – Unicellular eukaryotes and metazoans.....	37
2.7.2.1 – Physico-chemical particularities of environments sheltering chemosynthesis-based ecosystems	37
2.7.2.2 – Diversity, abundance and distribution of metazoan communities	38
Chapter II – State of the art and context of the study	41
1 – Discovery of metazoans associated with symbiotic bacteria in fluid-rich environments and questions.....	41
2 – Examples of symbiotic associations.....	46
2.1 – Extracellular symbioses.....	46
2.1.1 - <i>Alvinella pompejana</i> (Annelida : Polychaeta : Alvinellidae), the ‘Pompeii worm’	46
2.1.2 – <i>Rimicaris exoculata</i> (Arthropoda : Alvinocaridae).....	47

2.2 – Intracellular symbioses.....	47
2.2.1 – <i>Inanidrilus</i> and <i>Olavius</i> (Annelida : Oligocheata)	47
2.2.2 – Vestimentiferans and pogonophorans (Annelida : Siboglinidae)	48
2.2.3 – <i>Alviniconcha</i> and <i>Ifremeria</i> (Mollusca : Gastropoda : Provannidae).....	49
2.2.4 - Bivalves.....	50
2.2.4.1 - Thyasiridae.....	50
2.2.4.2 - Lucinidae.....	51
2.2.4.3 - Solemyidae.....	52
2.2.4.4 - Vesicomomyidae.....	53
3 – Symbiotic mytilids	54
3.1 – Taxonomy and distribution of symbiotic mytilids	54
3.2 – Bacterial symbiosis in mytilids	57
3.2.1 - Structures	57
3.2.2 – Sulfide-oxidizing symbiosis.....	57
3.2.3 – Methanotrophic symbiosis	58
3.2.4 – Dual symbiosis	58
3.2.5 – Other symbiotic associations, parasitism	59
3.3 - Reproduction.....	60
3.3.1 – Reproduction of the mytilids.....	60
3.3.2 – Symbiont transmission from one generation to the next.....	60
3.4 - Evolution.....	61
3.4.1 – Evolution in the genus <i>Bathymodiolus</i>	61
3.4.2 – Evolution of sulfide-oxidizing and methanotrophic symbionts	62
3.5 – Ecology of symbiotic mytilids	62
3.5.1 – Adaptations to the toxicity of fluids.....	63
3.5.2 – Chemical environment and its influence on symbiotic nutrition	63

Chapter III – Qualitative and quantitative characterization of symbiosis in mytilids : objectives, approaches and results..... 67

1 – Objectives of the study	67
2 – Strategy and techniques.....	67
2.1 – Strategy for the sampling and the study	67
2.2 – Origin of samples and cruises	69
2.3 – Techniques	69
2.3.1 – Characterization of symbiont diversity using 16S rRNA sequence analysis.....	71
2.3.2 – Hybridization techniques.....	73
2.3.3 – Stable isotope analysis on tissue and biomarkers.....	74
3 - Results.....	76
3.1 – Are the two <i>Bathymodiolus</i> species from the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites associated with the same bacterial symbionts, and are the relative abundances of symbionts influenced by fluid chemistry ?	76
Article 'A dual symbiosis shared by two mussel species, <i>Bathymodiolus azoricus</i> and <i>B. puteoserpentis</i> (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge'	76
3.2 – Which types of bacteria are associated with <i>Bathymodiolus</i> sp., a mytilid collected from cold seeps on the Gabon Margin, and can we show an 'intrasite' nutritional response linked to chemical parameters measured during the sampling ?101	
Article 'Dual symbiosis in a <i>Bathymodiolus</i> mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (South East Atlantic) : 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbiontes in the gills	103

3.3 – Which informations can we get from the comparative study of the diversity and nutritional role of bacteria associated with <i>Bathymodiolus heckeræ</i> , <i>B. brooksii</i> and <i>B. childressii</i> , three mytilids inhabiting cold seeps in the Gulf of Mexico	110
3.3.1 - Article ‘Diversity, relative abundance and metabolic capabilities of bacterial endosymbionts in three <i>Bathymodiolus</i> mussels (Bivalvia : Mytilidae) from cold seeps in the Gulf of Mexico’	110
3.3.2 – Supplementary work : development of a method to use 16S rRNA as a biomarker in bacteria-associated mytilids.....	154
3.4 – <i>Idas</i> sp., a small mytilid from a pockmark area in the eastern Mediterranean : which bacteria are associated with this close relative of <i>Bathymodiolus</i> ?.....	167
Article ‘Coexistence of thiotrophic, methanotrophic, methylotrophic and CFB bacteria as gill endosymbionts in <i>Idas</i> sp. (Bivalvia: Mytilidae), a mussel from a pockmark area in the eastern Mediterranean’	169

Chapter IV – General discussion of the results, conclusion and perspectives for future studies about symbiosis	193
1 – Diversity and biogeography of symbiotic bacteria.....	193
1.1 – Diversity of symbiotic bacteria, discovery of new groups.....	194
1.2 – New data about the biogeography and evolution of symbiosis.....	196
2 – Ecology of symbiosis in mytilids	197
2.1 – Metabolic capabilities of symbionts.....	197
2.2 – Variability of bacterial abundances and characteristics of the environment.....	197
2.3 – Nutritional role of symbionts	199
3 – Conclusion and perspectives about the study of symbiosis	200
Bibliography	201

Introduction

Les sources hydrothermales sous-marines ont été découvertes en 1977, 8 ans après que l'homme eut posé le pied sur la lune (Lonsdale 1977). Ces environnements, localisés au niveau des dorsales océaniques, sont caractérisés par l'émission de fluides chauds et chargés en composés toxiques. Ils abritent pourtant une biomasse considérable d'invertébrés inhabituels, ce qui a immédiatement suscité l'intérêt de la communauté scientifique (revue dans Van Dover 2000). Hormis leur originalité, les caractéristiques chimiques de ces environnements et l'existence d'analogues sur la 'Terre primitive' laissent penser que de telles sources hydrothermales auraient pu être un terrain propice à l'apparition des premières formes de vie (Shock 1994). Un peu plus tard, en 1984, des environnements de fluides froids au niveau desquels des fluides chargés en méthane diffusent à travers le sédiment, ont été décrits sur les marges continentales (Paull et al. 1984). Ils abritent des communautés de métazoaires relativement similaires à celles peuplant les sources hydrothermales (Sibuet and Olu 1998).

On a rapidement découvert que, dans les deux cas, c'est l'association symbiotique entre les invertébrés dominants et des bactéries chimiotrophes, capables d'assurer une production primaire en l'absence de lumière en utilisant conjointement des composés issus des fluides et d'autres présents dans l'eau, qui était à la base de ces communautés animales exubérantes (Cavanaugh et al. 1981; Felbeck et al. 1981; Fisher 1990). L'importance des phénomènes symbiotiques dans l'évolution des formes vivantes commençait à être reconnue par ailleurs, par exemple dans l'apparition de la cellule eucaryote (Sagan - Margulis 1967), si bien que l'étude des symbioses dans les écosystèmes profonds à base chimiosynthétique a pris un essor rapide. L'étude de ces symbioses est cruciale pour comprendre l'évolution et l'adaptation des organismes originaux peuplant les environnements de fluides chauds et froids. Ces symbioses uniques illustrent également un étape intermédiaire de l'évolution qui peut conduire, à terme, à l'intégration des différents partenaires en une entité supra-spécifique. Enfin, la compréhension du rôle des symbioses dans la productivité des écosystèmes à base chimiosynthétique apporte des informations pour évaluer l'impact de ces écosystèmes sur les grands cycles biogéochimiques.

De nombreux travaux ont été menés sur les symbioses de divers invertébrés. La plupart ont eu pour objectif de caractériser ces symbioses ou de caractériser leur environnement. En dépit de l'intérêt évident du couplage de ces deux types d'études, les exemples d'approches intégratives demeurent rares. La difficulté liée à la mise en place d'une

stratégie spécifique à appliquer lors des campagnes en mer, ainsi que les obstacles techniques liés à la collecte des données et des échantillons limitent la réalisation de telles études, qui seules pourtant pourraient permettre de mettre en lumière l'influence de l'environnement sur les symbioses chimiotrophes.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont pour objectif de répondre à un certain nombre des interrogations soulevées par l'existence et le fonctionnement des symbioses unissant métazoaires et bactéries chimiosynthétiques. L'étude porte principalement sur plusieurs espèces appartenant au genre *Bathymodiolus* (Bivalvia : Mytilidae), qui regroupe des moules de grande taille associées à des bactéries. Ces bivalves sont abondants dans de nombreux environnements hydrothermaux et de fluides froids en domaine profond, ce qui permet d'envisager des études comparatives et l'analyse biogéographique de leurs symbioses. Les bactéries associées à ces mytilidés sont de deux types, méthanotrophes et sulfoxydantes. Une grande variabilité existe dans la distribution des bactéries, puisque certaines *Bathymodiolus* hébergent un seul type de symbionte, tandis que d'autres abritent les deux types, avec des abondances variables (Cavanaugh et al. 1987; Fisher et al. 1993). Cette variabilité est une caractéristique originale des *Bathymodiolus*.

La caractérisation de la diversité phylogénétique et métabolique des bactéries symbiotiques associées à divers mytilidés, et de sa variabilité, constitue le premier objectif de ce travail. Les données disponibles dans la littérature restent en effet éparses, et nos connaissances sur la biogéographie et l'évolution des symbioses chez les mytilidés incomplètes. Le second objectif est de mettre en évidence un éventuel contrôle exercé par l'environnement sur cette diversité de bactéries, et sur l'abondance relative des différents types de symbiontes. L'existence d'une telle influence a souvent été suggérée (voir par exemple (Fiala-Médioni et al. 2002)), mais aucune étude n'a réellement combiné la caractérisation quantitative de la symbiose et celle de l'environnement. Enfin, l'examen du rôle nutritionnel des bactéries dans différents contextes écologiques constitue le troisième objectif de l'étude. L'existence d'une réponse passant par un ajustement de la contribution des différentes bactéries symbiotes en fonction des variations du milieu reste en effet discutée (Trask and Van Dover 1999; Colaco et al. 2002).

La description de la diversité et de l'abondance des bactéries a fait appel à diverses méthodes de biologie moléculaire, les plus quantitatives possibles. La caractérisation des paramètres physico-chimiques du milieu a été réalisée à l'échelle la plus pertinente possible par rapport aux organismes considérés. Le rôle nutritionnel des symbiontes a été examiné à

partir des signatures isotopiques des tissus, ainsi que de deux types de biomarqueurs (lipides et acides nucléiques). Ces approches complémentaires ont été appliquées à diverses espèces en vue d'établir des comparaisons, et en tenant compte du contexte fourni par les campagnes en mer.

Les résultats sont présentés en quatre volets. Les trois premiers sont organisés comme une progression depuis une approche qualitative vers une approche plus quantitative. Le premier volet met ainsi en évidence l'intérêt de la méthode d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes spécifiques (FISH) pour l'examen qualitatif des différences d'abondances relatives de symbiontes chez deux espèces de mytilidés collectées sur différents sites hydrothermaux de la ride Médio-Atlantique. Le second volet fait suite à la mission Biozaire 2 (Ifremer-Total, 2001) pendant laquelle une véritable approche intégrative a pu être entreprise pour l'étude des symbioses chez une nouvelle espèce de mytilidé identifiée sur le site de fluides froids Régab, dans le Golfe de Guinée. Les abondances relatives de symbiontes sulfoxydants et méthanotrophes, observées par FISH, ont pu être comparées aux données chimiques obtenues lors de la collecte des spécimens sur trois agrégats distincts. La mise en place d'une approche plus quantitative que le FISH est l'objet du troisième volet. Les bactéries symbiotiques associées à trois espèces de mytilidés collectées sur des sites de fluides froids du Golfe du Mexique (campagne Deep Seeps, WHOI, 2003) ont été caractérisées et identifiées par FISH. Les sondes ont ensuite été utilisées pour effectuer des hybridations quantitatives d'ARNr 16S sur membrane, ou slot blot (Stahl et al. 1988), afin de quantifier l'ARNr provenant des différents symbiontes. Cette méthode n'avait jusqu'alors jamais été appliquée à l'étude des symbioses d'invertébrés. Le rôle nutritionnel des symbiontes a été examiné grâce à l'analyse de la composition isotopique des tissus ainsi que de lipides biomarqueurs. Afin d'obtenir une meilleure estimation de la contribution des bactéries symbiotiques à la biomasse des mytilidés, une méthode visant à utiliser l'ARN ribosomique des hôtes et des différents symbiontes comme biomarqueur a été développée, faisant suite à des travaux démontrant la faisabilité de cette méthode sur des cultures pures de bactéries (MacGregor et al. 2002). Le dernier volet est la description de la symbiose d'un mytilidé de petite taille du genre *Idas*, collecté sur un site de pockmarks de l'est Méditerranéen. Les mytilidés du genre *Idas* peuplent non seulement les sites de fluides froids, mais également divers écosystèmes chimiosynthétiques atypiques comme les carcasses de baleines ou les bois coulés (Distel et al. 2000). Ce genre peu étudié est proche parent du genre *Bathymodiolus*. L'étude des symbioses de tels mytilidés présente donc un grand intérêt pour la compréhension de l'évolution des symbioses dans cette famille de bivalves.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente le contexte général de l'étude, c'est à dire d'une part des généralités sur la symbiose en tant que facteur d'adaptation et d'évolution et son importance dans le vivant, et d'autre part les écosystèmes profonds à base chimiosynthétique, leurs caractéristiques géologiques, les grands cycles biogéochimiques, et quelques caractéristiques des communautés animales qui les peuplent. Le second chapitre, qui expose l'état de l'art et le cadre de l'étude, présente la découverte et la diversité des métazoaires associés à des bactéries dans les écosystèmes à base chimiosynthétique en mettant l'accent sur les mytilidés du genre *Bathymodiolus*. Le troisième chapitre présente les objectifs du travail, l'approche expérimentale et les manuscrits correspondant aux résultats obtenus pour les quatre volets évoqués précédemment. Le chapitre quatre est une discussion générale. Les principaux résultats concernant la diversité, la biogéographie, l'évolution et le potentiel métabolique des bactéries symbiotiques associées aux mytilidés, ainsi que la variabilité des abondances des différents symbiontes en fonction des paramètres de l'environnement et que leur rôle nutritionnel sont rassemblés et mis en perspective. Des pistes sont envisagées pour des travaux futurs.

Chapitre I - Contexte général de l'étude

1 - Qu'est ce que la symbiose ?

1.1 - Bref historique et définition

La symbiose a été définie à la fin du 19^{ème} siècle par de Bary comme le fait pour deux organismes distincts de vivre ensemble (De Bary 1879). D'abord regardée comme une curiosité scientifique mineure il faudra attendre 1963 pour qu'une première conférence, organisée à l'initiative de la société de microbiologie générale de Londres, lui soit consacrée (Smith and Douglas 1987). L'importance évolutive des phénomènes symbiotiques a été pressentie dès 1967 par Lynn Sagan Margulis, qui a émis l'hypothèse que certains organites de la cellule eucaryote étaient issus de bactéries endosymbiotiques (Sagan - Margulis 1967). A la même époque, Buchner propose une synthèse démontrant l'importance écologique des symbioses entre animaux et microorganismes (Buchner 1965). De tels travaux ont favorisé l'essor de l'étude des interactions symbiotiques, à laquelle le développement de la biologie moléculaire a fourni de nouveaux et puissants outils ces dernières années (Moran and Baumann 2000).

Le concept même de symbiose pose la question de la nature des rapports établis entre les partenaires, ainsi que de leur durée. Dans sa définition originale, De Bary incluait à la fois les interactions mutualistes, dans lesquelles chaque partenaire tire un bénéfice, et les interactions parasitiques, le bénéfice d'un des partenaires se faisant au détriment de l'autre. Une variété de définitions existent, qui dépendent bien souvent du point de vue des scientifiques qui les emploient en introduisant des limites ou des biais. Si l'usage 'courant' du terme le substitue au mutualisme, la difficulté réelle à qualifier et à quantifier les 'bénéfices' réciproques des associations symbiotiques nous conduira ici à utiliser le terme symbiose dans son sens original.

1.2 - Le B à BA du 'vivre ensemble' et vocabulaire

La cohabitation entre organismes dans une symbiose est un phénomène complexe. Chaque partenaire possède des caractéristiques physiques, métaboliques ou physiologiques qui lui sont propres et découlent de son histoire évolutive, et auxquelles correspondent des besoins et des stratégies spécifiques. Vivre ensemble suppose de rendre compatibles les

modes de vie des partenaires, c'est à dire être capable de se rencontrer, de se reconnaître, de communiquer, d'établir et de maintenir une relation.

Par commodité, lorsque les partenaires sont de taille distincte, le plus grand sera souvent qualifié d' 'hôte' et le plus petit de 'symbionte', sans que cela préjuge de la nature des relations (Smith and Douglas 1987). Chaque partenaire peut avoir un spectre plus ou moins large d'organismes avec lesquels il peut entrer en symbiose, qui détermine la spécificité de l'association. Une symbiose peut exister durant tout ou partie du cycle biologique de chaque partenaire, et peut être obligatoire ou facultative selon que la survie d'un ou des partenaires en dépend ou pas. Dans le cas des symbioses facultatives, le microorganisme hors de l'hôte est appelé 'forme libre', tandis que l'hôte dépourvu de symbiontes est 'aposymbiotique'. La localisation des symbiontes est un paramètre important : ils peuvent être situés à l'extérieur (ectosymbiose ou épibiose, comme dans le cas des bactéries situées sur la peau) ou à l'intérieur (endosymbiose, comme dans celui des bactéries du tube digestif) de l'hôte, ce dernier cas nécessitant de faire la distinction entre symbiose intra- et extra-cellulaires. Les symbiontes se transmettent à la génération suivante soit directement (transmission verticale), soit après un passage par l'environnement (transmission horizontale).

1.3 – La symbiose comme facteur d'adaptation, rôle des microorganismes symbiotiques

Les métazoaires sont chimiohétérotrophes. Leur métabolisme repose sur la consommation de matière organique en conditions aérobies. Les microorganismes (protistes, bactéries, archées) ont quant à eux des métabolismes beaucoup plus diversifiés (phototrophie, autotrophie...). L'association entre un métazoaire, qui constitue un habitat stable et régulé, et un microorganisme doté d'un métabolisme original peut permettre, en additionnant le potentiel des partenaires, de mieux exploiter une niche écologique ou d'en coloniser de nouvelles.

1.3.1 – Symbioses fixatrices de carbone inorganique par photosynthèse

De nombreux eucaryotes marins ou dulcaquicoles, qu'il s'agisse d'unicellulaires comme les ciliés ou les foraminifères ou de métazoaires tels les spongiaires, les cnidaires (coraux sclératinières, anthozoaires, schyphozoaires), les plathelminthes ou encore les bivalves, sont associés à des microalgues eucaryotes qui assurent une production primaire photosynthétique dont les produits sont transférés à l'hôte. De telles associations sont particulièrement intéressantes dans des milieux oligotrophes tels que les récifs coralliens ou les atolls. Les dinoflagellés du genre *Symbiodinium* sont ainsi associés aux coraux (Goodson et al. 2001) et aux bivalves des familles tridacnides (le géant *Tridacna maxima*) et unionidés

(*Anondonta*). Outre leur rôle de producteurs primaires, ces dinoflagellés jouent aussi un rôle dans l'absorption de l'azote (Goodson et al. 2001), et dans la calcification du squelette des coraux ou des tests des foraminifères (Goreau 1959). L'algue chlorophycée *Chlorella* s'associe quant à elle plutôt avec les invertébrés d'eau douce (Smith and Douglas 1987).

Divers genres de cyanobactéries photosynthétiques sont également capables de s'associer à des protistes, à une quarantaine de genres de porifères d'eaux tropicales et peu profondes ou de récifs coralliens, à des échiuriens, ou à des ascidies. On les trouve aussi en association avec des champignons (certains lichens), ou certaines plantes 'primitives' (mousses bryophytes, anthocerotophytes, lycopodiophytes, gymnospermes du groupe des cycadales...) (Smith and Douglas 1987; Taiz and Zieger 2002).

1.3.2 – Symbioses dans le tube digestif

Le tube digestif de nombreux animaux contient une microflore variée qui participe à la digestion des aliments et à la protection contre les pathogènes. Cette microflore est composée de microorganismes apportés par la nourriture, mais aussi de bactéries 'endogènes', la plupart du temps extracellulaires (Smith and Douglas 1987). Ainsi divers herbivores, depuis des invertébrés (termites) jusqu'à des mammifères (kangourou, colobe, paresseux, hippopotame, chameau, rongeurs, lagomorphes, chevaux, ruminants...) abritent une microflore cellulolytique composée de protistes (trichomonades, oxymonades, hypermastigida...) et de procaryotes (*Bacteriodes*, *Bacillus*, *Streptococcus*, archées méthanogènes...). Cette microflore leur permet d'exploiter l'énergie stockée dans les polymères végétaux (Smith and Douglas 1987). En outre, certains de ces symbiontes produisent des molécules indispensables à l'hôte que celui-ci ne synthétise pas (vitamines, acides aminés essentiels, certains lipides...), notamment lorsque la source de nourriture est pauvre. Chez les mollusques bivalves la famille des teredinidés, constituée d'espèces vermiformes à la morphologie très spécialisée, possède également une microflore de protéobactéries dont certaines sont cellulolytiques (Distel et al. 2002) (Sipe et al. 2000). Cette particularité est à l'origine de leur mode de vie xylophage unique chez les bivalves marins.

1.3.3 – Rôle des symbiontes dans l'éthologie et le cycle de vie des métazoaires

De nombreux métazoaires de l'océan profond, parmi lesquels de nombreux poissons téléostéens (Dunlap and Ast 2005), céphalopodes sépiolidés (Mc Fall-Ngai 2000), ou ascidies (Smith and Douglas 1987), sont capables de produire de la bioluminescence. Dans la plupart des cas, ce phénomène est dû à la présence de bactéries symbiotiques, notamment des genres *Photobacterium* et *Vibrio* (gamma protéobactéries), qui contiennent une enzyme dont le nom générique est la luciférase capable d'oxyder un substrat (nom générique : luciférine) en

produisant un photon. D'ordinaire ce phénomène ne s'observe que lorsqu'une certaine densité de bactéries est atteinte, mais les hôtes développent souvent des organes spécialisés, contractiles et pourvus de cellules chromatophores ou reflectrices, afin de cultiver ces bactéries et de contrôler leur densité, ce qui leur permet de déclencher des flashes lumineux à tout moment (Herring 2001). Cette bioluminescence, qui peut être utilisée pour la recherche de proies, de partenaires, ou pour distraire l'attention d'un prédateur, explique vraisemblablement le maintien de la fonction visuelle chez les animaux des grandes profondeurs (Herring 2001).

Les symbiotes peuvent aussi jouer un rôle dans la locomotion de leurs hôtes, comme c'est le cas chez certains protistes, tels la trichomonade *Mixotricha paradoxa*, qui sont associés à des spirochètes localisés à un pôle de la cellule et dont la rotation assure la mobilité de l'hôte. (Cleveland and Grimstone 1964).

L'influence des symbiotes sur la reproduction de leur hôte est illustrée par le cas des gamma protéobactéries du genre *Wolbachia* et des insectes qui les hébergent. La bactérie est capable de tuer ou de féminiser son hôte mâle, de favoriser la parthénogenèse, ou grâce à un système sophistiqué de poison / antidote d'empêcher la fusion d'un gamète atteint avec un non atteint (Wernegreen et al. 2003). *Wolbachia* contrôle ainsi le sex-ratio des populations naturelles, et favorise indirectement sa propre dispersion. Il s'agit d'un cas très proche du parasitisme. Chez certaines fourmis, on trouve également des bactéries capables de produire une phéromone utilisable par l'hôte pour accroître son succès reproducteur (Wernegreen et al. 2003).

L'efficacité de la symbiose, illustrée par les exemples ci-dessus, en fait un phénomène très répandu dans la nature, tant dans le monde procaryote qu'eucaryote, microbien qu'animal ou végétal. Elle peut intervenir à tous les niveaux de la vie de l'hôte, et influencer *in fine* son évolution, tout comme l'hôte influence celle des symbiotes

1.4 - La symbiose comme facteur d'évolution

La diversité des modalités d'association observées dans la nature entre métazoaires et microorganismes va d'associations ponctuelles, en passant par des exemples de co-évolution hôte symbiote (Nishiguchi et al. 1998; Goodson et al. 2001), jusqu'à une relation obligatoire avec réduction des génomes bactériens. Cette gradation illustre les différentes transformations phénotypiques et génotypiques qui accompagnent l'évolution de deux organismes distincts vers une entité supra-spécifique intégrée composite (Smith and Douglas 1987; Margulis and Fester 1991). On pense que les symbioses évoluent souvent à partir d'un parasitisme, et en

réponse à un environnement pauvre (Gil et al. 2004). Elles ont des origines multiples et plus ou moins anciennes dans l'histoire des taxons animaux (par exemple 200 millions d'années pour les symbioses entre insectes et *Buchnera* (Moran and Baumann 2000)). Comme chez les métazoaires, l'association symbiotique est apparue à de multiples reprises dans l'évolution des microorganismes, en particulier chez les alpha-, beta- et gamma-protéobactéries, (symbioses avec divers invertébrés marins, insectes ou plantes) ou chez les flavobactéries (Fig. 1.1) (Moran and Baumann 2000). La longue histoire commune de certaines associations entraîne des modifications plus ou moins spectaculaires chez les partenaires.

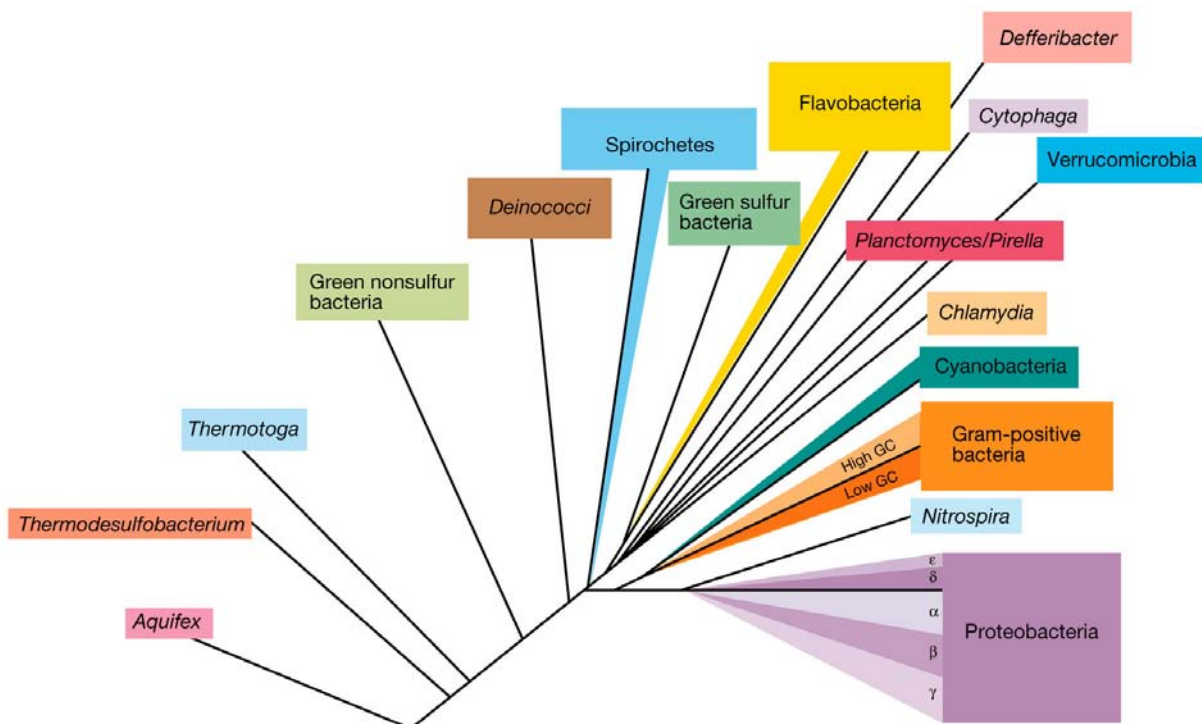


Fig. 1.1 : Arbre phylogénétique représentant les principaux phylums bactériens. Reconstruction basée sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S (voir encadré dans le chapitre 3) (Madigan et al. 2002).

1.4.1 – Quelques transformations phénotypiques liées à la symbiose

Les symbiontes intracellulaires perdent souvent leur enveloppe cellulaire et leur mobilité, devenant des structures parfois difficiles à identifier comme c'est le cas des cyanobactéries associées à l'algue *Cyanophora paradoxa* (glaucocystophycées) (Smith and Douglas 1987). Les hôtes peuvent également présenter des adaptations morphologiques plus ou moins poussées, par exemple la différenciation de cellules en bactériocytes contenant les symbiontes intracellulaires, ou l'élaboration d'organes destinés à cultiver les symbiontes (organes lumineux pour les bactéries bioluminescentes, zonation du tube digestif en 4 poches chez les ruminants...). Ces modifications peuvent affecter l'animal entier si la symbiose

modifie totalement son mode de vie, comme c'est le cas chez les bivalves teredinidés (associés à des bactéries cellulolytiques) dont le corps et la coquille se sont adaptées à un mode de vie de xylophage perceur (Sipe et al. 2000; Distel et al. 2002). Ces quelques exemples montrent que chaque partenaire s'adapte à la condition symbiotique, ces adaptations impliquant la plupart du temps des modifications génétiques.

1.4.2 - Transformations génétiques liées à la symbiose

On estime que 15 à 20% des insectes abritent des bactéries (Buchner 1965). La perte de gènes, soit qu'ils soient redondants avec des fonctions de l'hôte (Gil et al. 2004), soit qu'ils interviennent dans le métabolisme de composés non consommés par lui (Rio et al. 2003), est une tendance nette des symbiontes obligatoires. Les études menées sur des séquences de génomes entiers depuis quelques années ont montré que ce phénomène pouvait atteindre des proportions spectaculaires (revue dans (Gil et al. 2004)), à l'image de l'extrême réduction constatée chez les gamma protéobactéries symbiotiques du genre *Buchnera* dont le génome représente entre 450 à 653 kb selon les hôtes, soit seulement 1/10 de la taille des génomes de bactéries libres phylogénétiquement proches (Gil et al. 2002; Wernegreen et al. 2003).

Deux autres tendances, liées à la précédente, sont également observées chez les bactéries symbiotiques. Tout d'abord les endosymbiontes obligatoires, notamment lorsque leur transmission est verticale, connaissent une évolution plus rapide attribuée à l'existence de bottlenecks au moment de la transmission (peu de bactéries sont effectivement transmises, ce qui amplifie l'effet de la dérive génétique) (Woolfit and Bromham 2003), ou à l'augmentation directe du taux de substitution des nucléotides (Itoh et al. 2002). Cette accélération est observée à l'échelle de marqueurs génétiques, mais aussi de génomes entiers (Itoh et al. 2002). La seconde tendance est le transfert de gènes depuis les bactéries endosymbiotiques obligatoires vers le génome de leur hôte (Hoffmeister and Martin 2003), ce cas étant très bien documenté chez les plantes au niveau desquelles, suite à un transfert de gène depuis le chloroplaste, c'est le génome nucléaire qui code une des deux sous-unités de la RubisCO (ribulose 1,5 bisphosphate deshydrogénase), l'enzyme fixatrice de CO₂ dans le cycle de Calvin exprimée au niveau de l'organite (Margulis and Fester 1991).

1.5 – Importance écologique et évolutive de la symbiose

L'existence et la productivité des écosystèmes de récifs coralliens (Goodson et al. 2001), ou des écosystèmes forestiers (Taiz and Zieger 2002) repose en grande partie sur l'existence de symbioses photosynthétiques dans le premier cas, et fixatrices d'azote dans le second. La culture de papilionacées (pois, haricot...) pour la consommation et pour la

régénération en azote des sols cultivés, de même que l'élevage (notamment bovin) sont rendus possibles par les symbioses associant ces organismes à des procaryotes. La bioluminescence d'origine symbiotique concerne environ 90% des espèces animales des profondeurs (Herring 2001). D'autres exemples pourraient compléter cette liste destinée à souligner l'importance des symbioses dans l'environnement.

La symbiose est également un phénomène d'une importance évolutive considérable puisqu'il est admis qu'elle est à l'origine de la cellule eucaryote compartimentée telle que nous la connaissons. Nombre de résultats concordants (séquençage, biochimie, morphologie) indiquent que certains organites proviennent de bactéries endosymbiotiques, telles les mitochondries, descendantes d'une alpha protéobactérie dont le rôle aurait été la détoxification de l'oxygène à une période où il commençait à s'accumuler dans l'atmosphère, les flagelles (spirochetes), ou encore les chloroplastes (cyanobactéries photosynthétiques) (Margulis and Fester 1991). L'existence de gènes d'origine bactérienne dans les génomes eucaryotes atteste du haut degré d'intégration et de la longue histoire évolutive de ces symbioses (Margulis and Fester 1991; Madigan et al. 2002).

Jusqu'à récemment, la plupart des modèles étudiés ont été choisis en fonction de critères d'intérêt, agronomiques ou médicaux par exemple. Les symbioses des animaux marins, particulièrement celles des organismes des profondeurs, ont été nettement moins étudiées, or cet environnement abrite de nombreuses associations originales dont l'impact écologique est encore mal perçu. La découverte à la fin des années 70 des biomasses considérables d'invertébrés associés à des bactéries au niveau de sites hydrothermaux en domaine océanique profond a cependant renouvelé l'intérêt de la communauté scientifique (Lonsdale 1977), de même que celle des sources de fluides froids quelques années plus tard (Paull et al. 1984). L'existence de telles associations dans ces environnements 'extrêmes', a priori hostiles, dont des homologues ont été identifiés dans le registre fossile depuis les facies les plus anciens, pose de nombreuses questions sur l'apparition, l'évolution, et le fonctionnement de ces symbioses originales, ainsi que leur rôle dans l'écologie des océans (Fisher 1990; Van Dover 2000; Tunnicliffe et al. 2003). L'étude de ces symbioses à la lumière des concepts et idées développées à partir d'autres modèles constitue l'objet du présent travail de thèse.

2 - Les écosystèmes océaniques profonds à base chimiosynthétique

2.1 - L'océan profond

L'océan profond, qui couvre environ les deux-tiers de la superficie de notre planète, est souvent vu comme un biotope relativement uniforme plutôt pauvre en vie animale, et dont les écosystèmes dépendent de l'apport météoritique de composés organiques et de débris en provenance de la zone euphotique. Cette zone euphotique qui s'étend sur les 100 à 200 premiers mètres est l'endroit où la photosynthèse opère à grande échelle, la moitié de la fixation de carbone sur notre planète, grâce à une diversité de microalgues planctoniques unicellulaires comme *Synechococcus* ou *Prochlorococcus* (Partensky et al. 1999). La majeure partie de la superficie des grands fonds est représentée par des étendues sédimentaires au niveau de la plaine abyssale située entre 3000 et 6000 mètres. En s'approchant du fond l'hétérogénéité apparaît cependant, notamment par l'existence de traces laissées par les organismes benthiques ou épibenthiques (bioturbation). Loin d'être monotone le domaine océanique profond abrite une diversité de métazoaires de petite taille équivalente à celle d'une forêt primaire tropicale (Hessler and Sander 1967). La mégafaune et la macrofaune sont composées principalement d'échinodermes (oursins, cnidaires, holothuries, ophiures...), d'arthropodes (amphipodes, pycnogonides, décapodes...), de céphalopodes, de cnidaires (méduses, coraux, anémones...), de porifères (éponges), d'ascidies, de poissons (mixinidés, chondrichthyens, téléostéens), et de divers taxons vermiformes (annelides, echiuriens, siponculiens, nemertiniens, plathelminthes, priapulidés, hémichordés...). La faune de plus petite taille, moins facile à échantillonner et donc moins connue, est dominée par les nématodes. Elle se compose également de petits représentants des taxons évoqués ci-dessus, auxquels viennent s'ajouter les procaryotes, les eucaryotes unicellulaires (foraminifères, xénophyophores...), divers arthropodes (cumacées, tanaïdées, amphipodes, copépodes), des mollusques (bivalves, gastéropodes, scaphopodes) ainsi que certaines larves (Gage and Tyler 1991; Brusca and Brusca 2003).

L'existence d'hétérogénéités à petite échelle, ainsi que la grande superficie des fonds océaniques sont invoquées entre autres pour expliquer cette diversité, qui est contrebalancée par des biomasses plutôt faibles (Gage and Tyler 1991; Brusca and Brusca 2003). En dépit de l'apparente continuité de l'environnement profond, les faunes se différencient en régions biogéographiques délimitées, et selon la profondeur, en particulier sur les pentes continentales.

2.2 - Découverte et originalité des écosystèmes à base chimiosynthétique

La découverte en 1977, au large des Galapagos, de sources hydrothermales et des communautés animales associées a offert un contraste saisissant à cette plaine abyssale monotone (Lonsdale 1977). Des biomasses considérables d'invertébrés semblaient s'épanouir au voisinage de sorties de fluide à haute température et à haute teneur en composés toxiques (sulfures, métaux...). Quelques années plus tard, des écosystèmes similaires ont été découverts au niveau de sources de fluides froids enrichis en méthane sur les marges continentales (Paull et al. 1984; Juniper and Sibuet 1987; Sibuet et al. 1988; Sibuet and Olu 1998). Loin d'être hostiles à la vie, ces environnements apparaissent comme des oasis de vie sous marine (Carney 1994). La base de la chaîne alimentaire dans ces environnements, présente la particularité de ne pas reposer sur la photosynthèse, mais sur une production primaire chimiosynthétique autochtone réalisée par des bactéries autotrophes capables d'exploiter l'énergie chimique contenue dans des composés réduits des fluides pour assurer la fixation du carbone. L'importance du compartiment microbien dans la biogéochimie de ces environnements a très rapidement été reconnue (Jannasch and Nelson 1984; Jannasch and Mottl 1985). Un intérêt particulier s'est rapidement développé pour l'étude des 'extrêmophiles' peuplant les niches les plus inhospitalières (température, pression, toxicité...) (Prieur 1997; Nelson 1998; Rothschild and Mancinelli 2001). Le couplage direct entre biosphère et géosphère est à l'origine des écosystèmes peuplant ces environnements.

Même si ces habitats n'occupent qu'une petite portion des fonds océaniques (Tunnicliffe et al. 2003), ils sont des exemples d'écosystèmes originaux en terme d'adaptation des animaux à des conditions de pression, de température, de toxicité et d'hypoxie extrêmes (Rothschild and Mancinelli 2001). De plus, ces environnements sont des analogues potentiels des environnements anciens au niveau desquels on pense que la vie est apparue. En effet, l'existence d'environnements très similaires est attestée dans des roches très anciennes (roches de Pilbara, etc...) (Shock 1994). Toutefois, dans les écosystèmes actuels et à l'exception des procaryotes capables de vivre en conditions anaérobies, l'utilisation de l'oxygène par un grand nombre de procaryotes et la totalité des métazoaires montre une dépendance de ces écosystèmes vis-à-vis de la photosynthèse (Tunnicliffe et al. 2003).

2.3 – Sources de fluides froids

Une quinzaine de sites de fluides froids ont été explorés, et environ 24 ont été identifiés sur les marges continentales actives (zones de subduction) et passives, en contexte sédimentaire, entre 400 et 6000 mètres (Sibuet and Olu 1998; Sibuet and Olu-LeRoy 2002)

(Fig. 1.2 et 1.3). Dans ces environnements, des fluides réduits à basse température, riches en méthane sont émis à travers le sédiment. Les flux sont généralement lents (Tunnicliffe et al. 2003; Henry and Bourlange 2004).

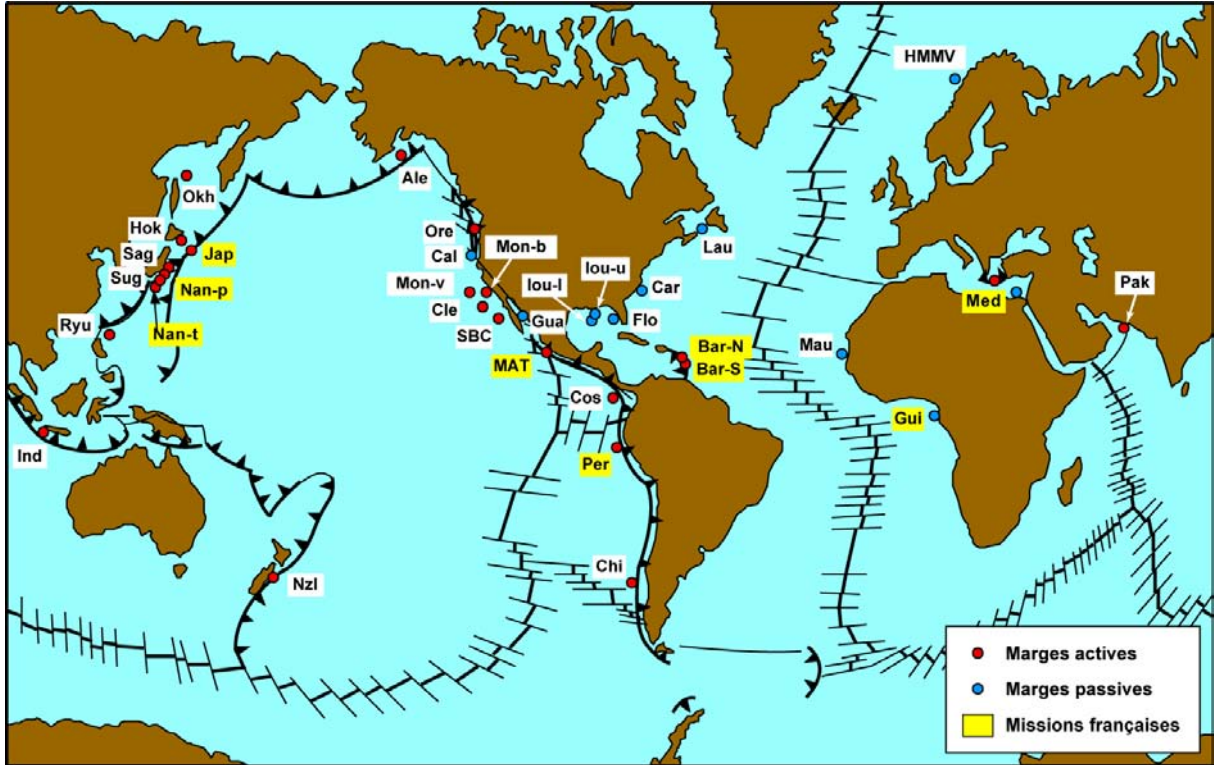


Fig 1.2 : Carte de localisation des sites de fluides froids dans le monde, figurant également les limites des plaques tectoniques (les flèches indiquent les zones de subduction. D’après Sibuet et Olu 1998.

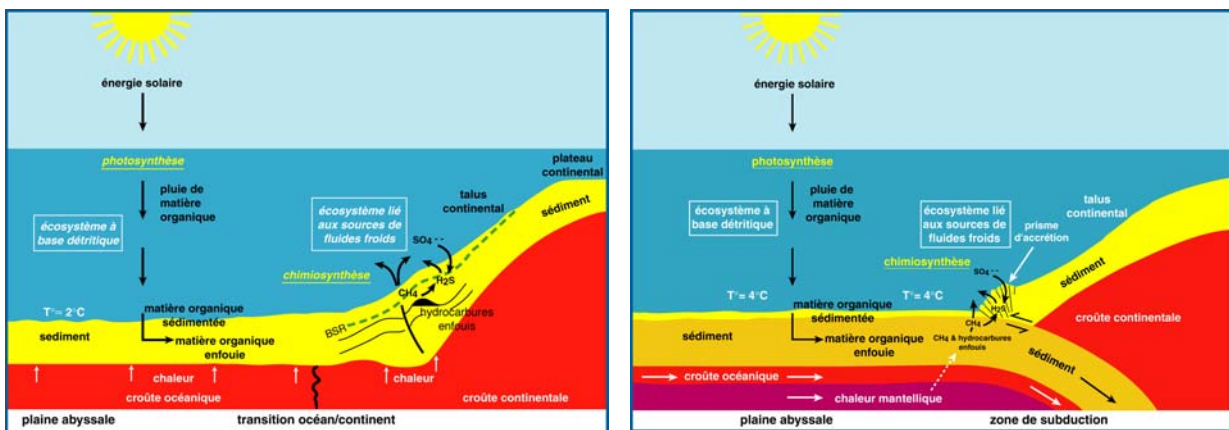


Fig. 1.3 : Schéma du fonctionnement d’un site de fluides froids en contexte de marge passive (gauche) et active (droite). Schéma extrait de Sibuet et Olu-LeRoy 2002

2.3.1 – Origines du méthane et hydrates de gaz

Le méthane trouve son origine soit dans la réduction de la matière organique par l'action de la température au fur et à mesure de son enfouissement sous le sédiment (méthane thermogénique), soit dans la méthanogenèse biologique par des archées en milieu anaérobie (Jannasch and Nelson 1984) (méthane biogénique, voir I-2.7.1.1) (Fig. 1.4). La détermination de l'origine du méthane se base sur l'examen de la signature isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) et de l'hydrogène (D), le méthane d'origine biogénique ayant une signature en $\delta^{13}\text{C}$ très négative. La co-occurrence des deux origines sur un même site est possible, comme dans certaines zones du Golfe du Mexique (Sassen et al. 1999; Sibuet et al. 2002; Sager et al. 2003; Sassen et al. 2004). Le méthane, en tant que gaz, peut ensuite remonter à travers le sédiment, et même former des bulles observables sur le fond, ou bien être immobilisé à basse température et haute pression sous une forme hydratée métastable (c'est à dire qu'une variation de l'environnement va la dissocier) baptisée hydrate de gaz. Ces hydrates ressemblent à de la glace, et affleurent parfois sur le fond comme dans le Golfe du Mexique ou dans le Golfe de Guinée (Sassen et al. 2004). Ils constituent le plus important réservoir sous-marin de méthane.

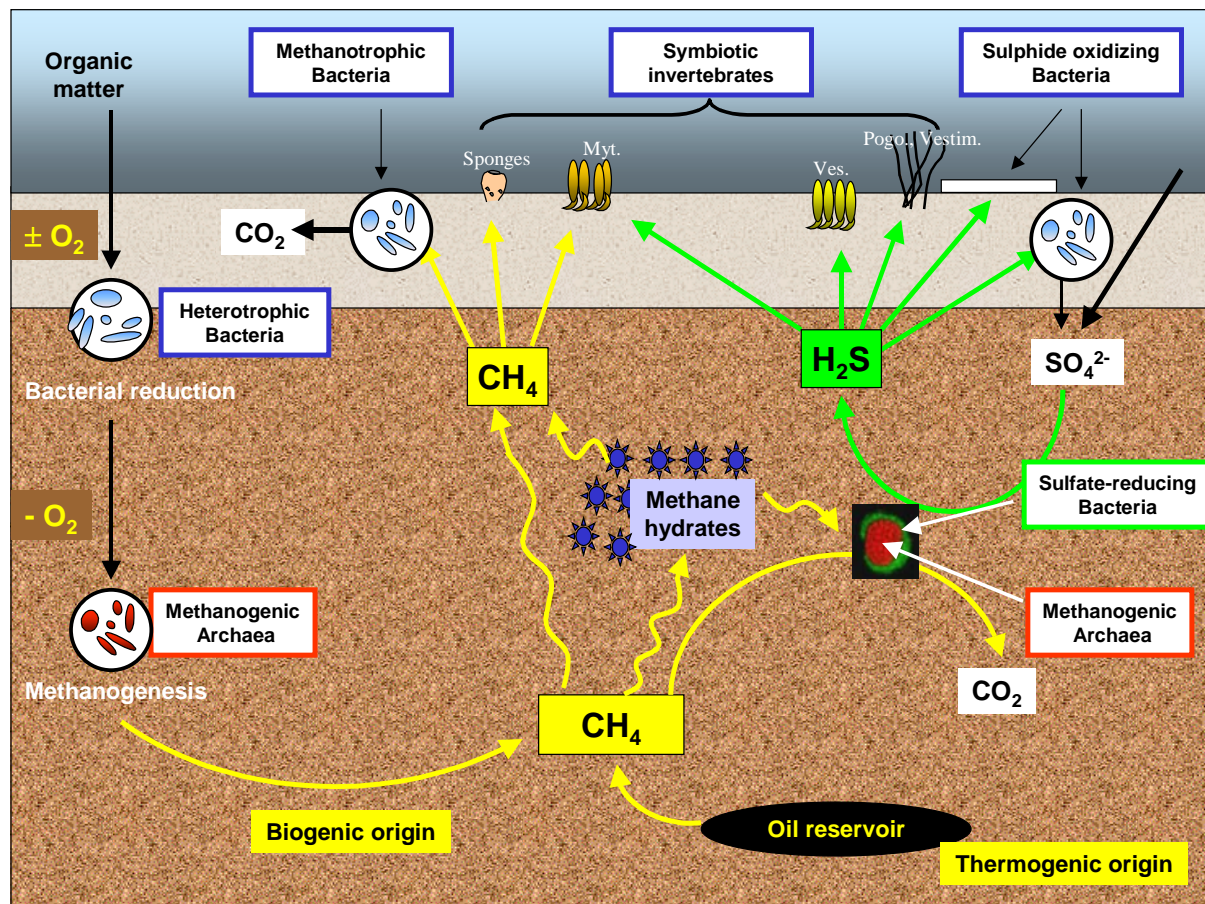


Fig. 1.4 (page précédente): Rôle du méthane au niveau des sites de fluides froids. Le méthane thermo- ou biogénique suinte à travers le sédiment ou est stocké sous forme d'hydrates de gaz. L'oxydation anaérobie du méthane accroît la quantité de sulfure d'hydrogène dans le sédiment. Méthane et sulfure d'hydrogène sont les composés utilisés par la plupart des bactéries symbiotiques associées aux métazoaires dominants sur le fond. D'après T. Nadalig.

2.3.2 – Fluides et édifices

Outre leur richesse en méthane, les fluides peuvent être hypersalins et contenir divers gaz et hydrocarbures (notamment dans le cas où du pétrole est enfoui), mais aussi être enrichis en sulfure d'hydrogène issu de la sulfato-réduction, couplée ou non à l'oxydation anaérobie du méthane (Borowski et al. 1999; Boetius et al. 2000) (voir I-2.7.1.2). La remontée des fluides est due soit à des phénomènes de diapirisme (Sager et al. 2003), soit à l'apparitions de failles consécutives au relachement de forces compressives ou extensives (prisme d'accrétion sédimentaire de la Barbade ou du Japon (Brown and Westbrook 1988; Henry et al. 1990; Le Pichon et al. 1990; Le Pichon et al. 1994)).

Outre les hydrates de gaz (Fig. 1.5A), divers types de structures géologiques peuvent être observés sur de tels sites, selon les flux et les caractéristiques des sédiments. Des volcans de boue (Fig. 1.5B) issus d'une forme de volcanisme sédimentaire, situés éventuellement au sommet de monts et constitués de boue, de carbonates ou d'hydrates de gaz (Sager et al. 2003), ont par exemple été identifiés au niveau de la marge Norvégienne (Haakon Mosby), de l'est de la ride Méditerranéenne (MEDINAUT/MEDINETH shipborad scientific parties 2000; Aloisi et al. 2004 et Caldera, obs. pers.), ou du Golfe du Mexique (sur Louisiana Slope (Sager et al. 2003)). Des lacs de saumure anoxique et hypersaline se rencontrent parfois au voisinage de ces volcans (Huguen et al. 2004). La température de ces saumures et des boues peut atteindre 15°C en surface pour une température d'environ 2°C dans l'eau environnante (MacDonald 1998). Un autre type de structure est le 'pockmark', qui correspond à une dépression locale peu profonde du fond océanique, liée à la présence de fluides ou d'importantes quantités de sels dans le sous-sol. Ces pockmarks sont caractérisés par l'abondance de croûtes carbonatées (CaCO₃) authigéniques (formées *in situ* (Sassen et al. 2004)) (Fig. 1.5C). La précipitation de ces croûtes est favorisée par l'alcalinité des fluides interstitiels qui est accrue par l'activité des bactéries sulfatoréductrices (Aloisi et al. 2002; Arvidson et al. 2004), le CO₂ inorganique étant disponible en excès, apporté entre autres par les bactéries méthanotrophes. Ces croûtes peuvent recouvrir de grandes surfaces, et forment

un substrat propice à la colonisation par des organismes sessiles ((Olu-LeRoy et al. 2004) et obs. pers.)

On sait peu de choses sur la durée de vie de ces sites, mais compte tenu du contexte tectonique différent et non associé à l'accrétion le long des dorsales, on pense qu'elle est plus longue que celle des sites hydrothermaux. On sait par ailleurs que les volcans de boue ou les saumures correspondent à des sites plus actifs, et probablement plus jeunes, tandis que les croûtes carbonatées se forment lorsque les flux sont plus faibles, comme c'est le cas à la fin d'un cycle d'émission (Foucher, comm. pers. ; Aloisi et al. 2004).

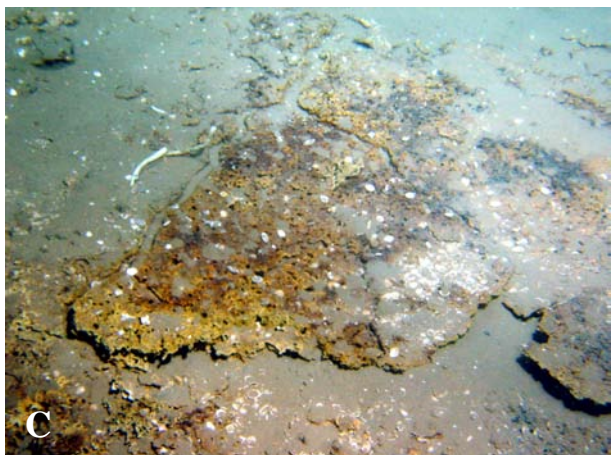
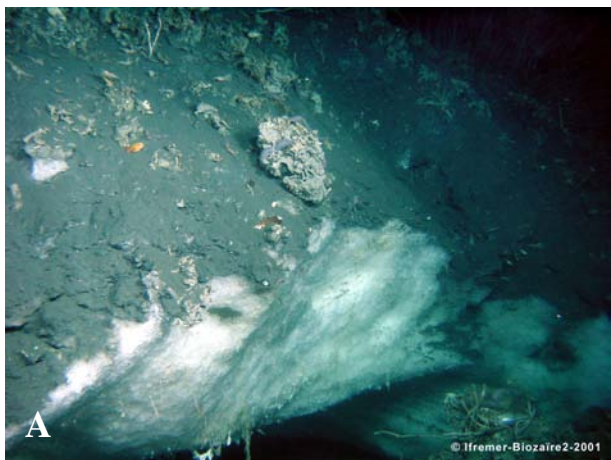


Fig. 1.5 : Edifices observées au niveau des sites de fluides froids. **A :** Hydrates de gaz affleurant sur le fond au niveau du site Régab (Golfe de Guinée, marge Gabonaise). Photo Ifremer, mission Biozaire 2 (2001). **B :** Sortie de fluide sur un volcan de boue au large du delta du Nil (Méditerranée). Photo Ifremer, campagne Nautinil (2003). **C :** Croûtes carbonatées sur un site de pockmarks dans la zone centrale au nord du delta profond du Nil (Méditerranée). Photo Ifremer, campagne Nautinil (2003).

2.4 - Sources hydrothermales

Les sites d'activité hydrothermale sont principalement localisés au niveau des dorsales qui sont le lieu d'accrétion de la croûte océanique à partir du magma sous jacent, au niveau de la limite entre deux plaques tectoniques s'éloignant l'une de l'autre (Pomerol and Renard 1997) (Fig. 1.6). Ces dorsales océaniques représentent un réseau continu de plus de 60 000 km dont seule une infime portion a été explorée (Desbruyères et al. 2000; Tunncliffe et al. 2003).

Des phénomènes d'hydrothermalisme sont également observés au niveau des bassins avant- et arrière-arc, ou en contexte de volcanisme de point chaud (Van Dover 2000). Des fluides réduits portés à des températures pouvant atteindre 350°C sont émis, établissant des gradients brutaux et instables (Gage and Tyler 1991; Von Damm 1995; Van Dover 2000). Le voisinage de la dorsale, d'âge récent, est généralement dépourvu de sédiment puisque celui-ci se dépose progressivement. Cependant, quelques sites comme par exemple le bassin de Guaymas sont riches en sédiment (Lonsdale and Becker 1985; Van Dover 2000).

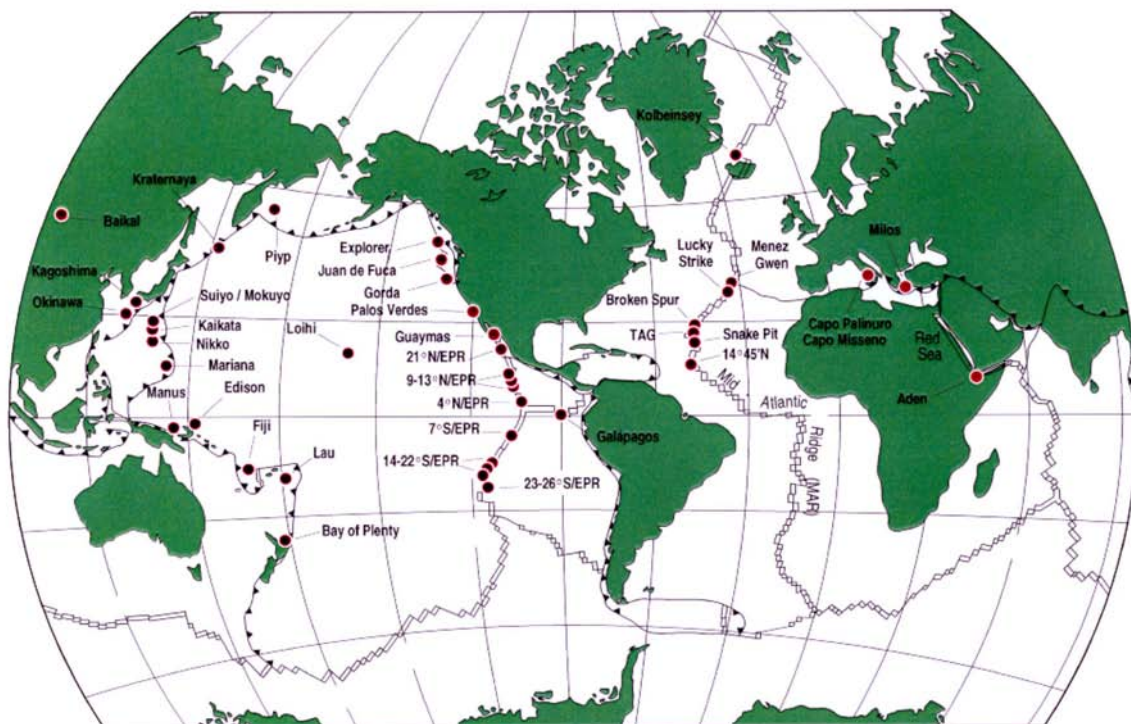


Figure 1. Geographic location of known hydrothermal zones with associated fauna. Characteristics of each zone are given in Table 1.

Fig. 1.6 : Carte de localisation des sites hydrothermaux dans le monde, le long des dorsales.

2.4.1 – Origine du phénomène hydrothermal

La dissipation de l'énergie géothermique au niveau des dorsales est à l'origine des mouvements convectifs d'eau et de fluides à l'intérieur de la croûte océanique. Ces mouvements sont liés à la percolation d'eau à travers les irrégularités de la croûte (failles, pores...) en présence d'un gradient géothermique élevé, et en permettent la dissipation (Tunnicliffe et al. 2003). A l'échelon global, l'intensité du phénomène hydrothermal et du transit des eaux par des cellules convectives influencent considérablement la chimie de l'océan (Elderfield and Schulz 1996).

2.4.2 – Fluides et édifices

Au cours de leur transit dans la croûte, les fluides changent de composition, s'acidifient, s'enrichissent notamment en ions métalliques, en sulfure d'hydrogène, en dihydrogène et en composés réduits d'origine géochimique (parfois du méthane ou même des molécules organiques comme sur le site Rainbow localisé sur la ride médio Atlantique), deviennent anoxiques, et voient leur température s'élever (Von Damm 1995) (Fig. 1.7). La composition de ces fluides dépend de la nature des roches sous-jacentes et de l'influence exercée par la pression au travers des phénomènes de séparation de phase au niveau des fluides, et varie d'un site à l'autre (Fornari and Embley 1995), mais aussi, dans l'espace et dans le temps, au sein d'un même site (Johnson et al. 1986). Au niveau de leurs points de sortie, les fluides canalisés peuvent atteindre des températures de l'ordre de 350°C, ou être plus diffus, avec des températures plus basses. Les spectaculaires cheminées hydrothermales se forment à haute température (> 250°C) par la précipitation de sulfures métalliques, de pyrite ou de barite au contact de l'eau de mer riche en oxygène (Van Dover 2000; Tunnicliffe et al. 2003). La longévité de l'activité hydrothermale au niveau d'un site dépend de la vitesse d'accrétion de la dorsale, mais est plutôt courte comparée à celle des sites de fluides froids, allant de quelques dizaines d'années sur des dorsales rapides comme celle du Pacifique oriental, à quelques

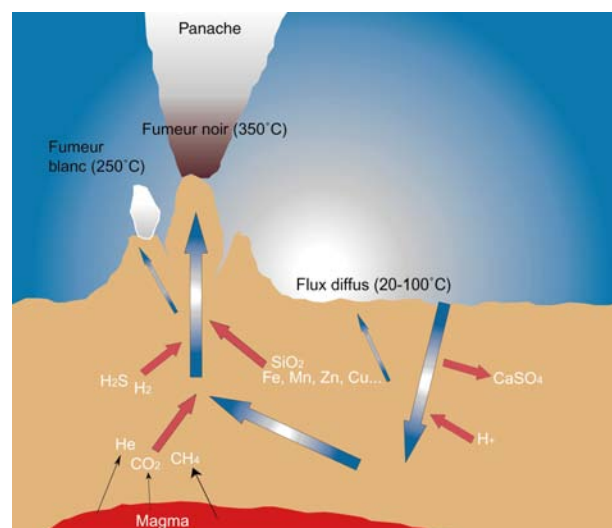


Fig.1.7 : Vue en coupe d'un fumeur. Le trajet de l'eau dans la croûte océanique est figuré par les flèches bleues, les flèches rouges et noires symbolisent les échanges chimiques.

dizaines de milliers d'années sur des dorsales lentes comme la ride Médio-Atlantique (Van Dover 2000). Malgré leurs origines distinctes, les sites hydrothermaux et les sites de fluides froids sont parfois géographiquement très proches, comme à Guaymas Basin (Sibuet and Olu 1998).

2.5 - Autres écosystèmes à base chimiosynthétique

D'autres environnements abritant des métazoaires associés à des bactéries chimiosynthétiques sont trouvés au fond de l'océan, notamment associés à des grandes quantités de débris comme les carcasses de baleines (Baco and Smith 2003) ou encore les bois coulés (Distel et al. 2000). De nombreuses et vastes zones de minimum d'oxygène sont également connues, particulièrement au niveau des marges continentales et des zones d'upwelling (Helly and Levin 2004). A l'extrême, certaines zones comme les couches profondes de la mer Noire sont quasiment anoxiques. De tels bassins anaérobies abritent principalement certains procaryotes, seuls capables de vivre sans oxygène.

2.6 - Méthodes de recherche et localisation des sites de fluides froids et chauds

La recherche des sites hydrothermaux et de fluides froids représente un défi technologique, car elle doit s'opérer depuis la surface. Elle fait intervenir divers outils de la géophysique destinés à repérer des structures identifiables en cartographiant le fond et sa réflectivité (zones de fortes réflectivité liées à des encroûtements, monts, volcans de boue), au niveau de profils sismiques (poches de gaz sous le sédiment, failles), ou par détection de traceurs chimiques comme l'hélium ou le manganèse, d'anomalies de densité, de méthane, ou de température dans la colonne d'eau (liées par exemple à des sorties de fluides ou à des panaches hydrothermaux). Les sondeurs 35 kHz utilisés pour la pêche peuvent également servir à mettre en évidence ces anomalies. De plus en plus, des AUV (Autonomous Underwater Vehicles) sont utilisés pour cartographier des zones. De telles méthodes ont permis d'identifier de nombreux sites hydrothermaux et de fluides froids dont certains ont par la suite pu être explorés à l'aide de submersibles habités ou non afin d'y rechercher d'éventuelles formes de vie caractéristiques.

2.7 - Ecosystèmes associés

2.7.1 - Le compartiment microbien, acteurs et cycles

La productivité exceptionnelle des écosystèmes à base chimiosynthétique trouve sa source dans deux phénomènes : l'apport de composés réduits par les fluides, et la

chimioautotrophie qui permet à certains procaryotes d'en extraire l'énergie pour assurer une production primaire endogène (Nelson 1998) (Fig. 1.1 et 1.8). Tout organisme a en effet besoin d'une source d'énergie et d'une source de carbone. La collecte d'énergie repose le plus souvent sur le prélèvement d'électrons sur un composé et leur transfert le long d'une chaîne de réactions membranaires d'oxydoréduction couplées à la génération d'ATP ou de pouvoir réducteur, jusqu'à un accepteur final (Pelmont 1993). La chimioautotrophie repose d'une part sur la capacité à extraire l'énergie chimique contenue dans les composés réduits apportés en abondance par les fluides grâce à leur oxydation par des composés oxydés présents dans l'eau de mer (chimiotrophie), et d'autre part sur la capacité à utiliser cette énergie pour assurer la fixation de carbone inorganique (autotrophie) (Madigan et al. 2002).

L'originalité des sources de fluides chauds et des sources de fluides froids est l'émission de fluides riches en composés réduits, bons donneurs d'électrons, dans l'eau du fond riche en oxygène, créant une zone de mélange turbulent entre zone oxygène et anoxique. L'inhabituelle co-occurrence de bons donneurs et de bons accepteurs d'électrons fournit aux micro organismes chimioautotrophes peuplant ces zones une grande quantité d'énergie utilisable pour la production primaire. La versatilité métabolique remarquable des procaryotes leur permet en outre de s'adapter aux variations inhérentes à ces environnements (Nelson 1997).

La multiplicité des substrats physiques (sédiment, surfaces minérales et biologiques, particules en suspension...), ainsi que l'existence de gradients physicochimiques de grande amplitude (température, pH) liés au mélange turbulent des fluides avec l'eau de mer fournit une variété de niches écologiques potentielles aux microorganismes, et explique la diversité constatée lors des inventaires, notamment moléculaires, réalisés d'une part au niveau des sources de fluides froids (Boetius et al. 2000; Orphan et al. 2001; Orphan et al. 2001; LaMontagne et al. 2004) et des hydrates de gaz associés (Mills et al. 2005), et d'autre part au niveau des sources hydrothermales (Jannasch and Mottl 1985; Reysenbach et al. 2000; López-García et al. 2003; Elsaied et al. 2005). Cette diversité semble néanmoins se réduire à l'approche des extrêmes, à l'image du pôle chaud des environnements hydrothermaux occupé presque exclusivement par des archées hyperthermophiles anaérobies (Nelson 1998; Takai and Horikoshi 1999; Querellou et al. 2001; Takai et al. 2001; Alain et al. 2004; Schrenk et al. 2004). Les processus de colonisation bactérienne semblent impliquer des successions de microflore, avec une diversité étroite de pionniers, notamment des epsilon protéobactéries (Reysenbach et al. 2000; López-García et al. 2003). Les procaryotes peuplant les environnements riches en fluides ont un rôle capital dans les cycles biogéochimiques.

Métabolisme	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Source de carbone	Organismes	Groupes représentatifs
Autolithotrophe	H ₂	O ₂	CO ₂	Oxydatrices de l'hydrogène	Protéobactéries, Gram positives, <i>Aquifex</i>
	S ²⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	O ₂	CO ₂	Sulfoxydantes	Protéobactéries
	Fe ²⁺ , (Mn ²⁺)	O ₂	CO ₂	Fer et manganèse oxydantes	Protéobactéries
	NH ₄ ⁺ , NH ₃ , NO ₂ ⁻	O ₂	CO ₂	Nitrifiantes	Protéobactéries, <i>Nitrospira</i>
	CH ₄ , CO, composés en C1	O ₂	CO ₂ , Composés en C1	Méthanotrophie et méthylotrophie	Gamma (Type I) et alpha (Type II) protéobactéries (méthanotrophes)
	CH ₄	SO ₄ ²⁻ (partenaire dans le consortium)	CO ₂ ou CH ₄	Oxydation anaérobie du méthane	Archées (groupes ANME)
	H ₂	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrifiantes	+
	H ₂	S ⁰ , SO ₄ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	CO ₂	Sulfo, sulfato et thiosulfate réductrices	Delta protéobactéries
	H ₂	CO ₂	CO ₂	Méthanogènes et acétogènes	Archées méthanogènes
NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻ , (NO ₃ ⁻ , Fe ³⁺ ?)	CO ₂	Oxydation anaérobie de l'ammoniac	Planctomycetes	
Hétérotrophe	Substrat organique	O ₂	Substrat organique	Hétérotrophes aérobies	+
	Substrat organique	NO ₃ ⁻	Substrat organique	Dénitrifiantes	+
	Substrat organique	Fe ³⁺ , Mn ²⁺		Fer réductrices	<i>Defferibacter</i> , <i>Geovibrio</i>
	Substrat organique	S ⁰ , SO ₄	Substrat organique	Sulfure et sulfato réductrices	Delta protéobactéries
	Substrat organique	Substrat organique	Substrat organique	Hétérotrophes aérobies et bactéries fermentatrices	Gamma protéobactéries, gram positives, <i>Thermotoga</i> , +...

Fig. 1.8 : Types de chimiotrophie, d'après (Jannasch and Mottl 1985; Madigan et al. 2002). Pour la méthanotrophie, elle ne peut être considérée comme une forme d'autotrophie *sensu stricto* qu'à condition que le méthane utilisé ne soit pas d'origine biogénique, ou que seul CO₂ soit utilisé comme source de carbone. Dans le cas de l'oxydation anaérobie du méthane, l'accepteur indiqué est celui du partenaire bactérien impliqué. Le signe + indique que le métabolisme est accessible à une très grande diversité de procaryotes.

2.7.1.1 - Cycle du carbone

2.7.1.1.1 – Méthanogenèse et méthanotrophie

Comme évoqué précédemment, le méthane peut avoir une origine biogénique par l'action de procaryotes anaérobies strictes, les archées méthanogènes. Ces archées utilisent le dihydrogène H₂ (parfois le formate, le monoxyde de carbone ou certains alcools) comme donneur d'électrons, et le dioxyde de carbone CO₂ (parfois l'acétate ou des composés méthylés) comme accepteurs et comme source de carbone. Cette voie fait intervenir des coenzymes et des cofacteurs spécifiques (methanofurane, methanoptérine coenzyme M...) (Pelmont 1993, Madigan et al. 2002). Certaines de ces archées, parmi les groupes ANME (Knittel et al. 2005), sont capables d'inverser la méthanogenèse afin d'oxyder le méthane en conditions anaérobies (Anaerobic Oxidation of Methane, AOM), grâce à leur association symbiotique (consortium) avec des delta protéobactéries sulfatoréductrices telles *Desulfococcus* ou *Desulfosarcina*, par un mécanisme encore peu connu, mais dont on pense qu'il est basé sur l'appauvrissement du microenvironnement en protons suite à leur utilisation par les sulfato réductrices, ce qui crée localement des conditions dans lesquelles la 'reverse méthanogénèse' est thermodynamiquement favorisée (Boetius et al. 2000; Orphan et al. 2001; Orphan et al. 2001). Ces consortia sont particulièrement actifs à l'interface entre hydrates de gaz et sédiment (Lanoil et al. 2001; Orcutt et al. 2004). L'oxydation anaérobie du méthane est extrêmement répandue et active au niveau des marges continentales en contexte de fluides froids, notamment dans les environnements riches en hydrates de gaz, et joue un rôle capital dans la régulation de notre climat, le méthane étant un gaz à effet de serre plus redoutable que le dioxyde de carbone (Kvenvolden 1999).

La méthanotrophie au sens strict est réalisée par un certain nombre de bactéries aérobies, notamment parmi les alpha (type I) et gamma protéobactéries (type II), qui oxydent le méthane et l'utilisent comme source d'électrons et de carbone. Ces bactéries possèdent une enzyme particulière, la méthane monooxygénase, qui oxyde le méthane en méthanol en présence d'oxygène et de dihydrogène (Anthony 1982) (Fig. 1.9). Des résultats récents indiquent néanmoins quelques similitudes entre les voies de méthanotrophie et de méthanogenèse, qui pourraient indiquer une origine évolutive commune suivie de transferts horizontaux de gènes (Chistoserdova et al. 1998)

2.7.1.1.2 – Production primaire

Si l'apport météoritique de carbone issu de la zone euphotique (et donc de la photosynthèse) participe à l'écologie des écosystèmes à base chimiosynthétique, leur originalité réside dans l'abondance de bactéries et d'archées autotrophes capables de fixer le

dioxyde de carbone ou l'ion bicarbonate (HCO_3^-) dissous dans l'eau en utilisant l'énergie chimique des composés réduits des fluides.

La fixation du carbone se fait le plus souvent par la voie de Calvin-Benson au moyen d'une ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO) plus ou moins similaire à celle employée par les organismes photosynthétiques. Cette enzyme assure des fonctions d'oxygénase et de carboxylase, mais en temps normal la fixation de dioxyde de carbone est favorisée. Deux formes de RuBisCO sont communes : la forme I est adaptée à des conditions oxydiques, la forme II à des conditions plutôt anoxiques (Robinson and Cavanaugh 1995). Ces deux formes diffèrent par leur structure, mais aussi par la signature isotopique qu'elles génèrent, liée à une discrimination différente contre l'isotope lourd du carbone (Scott et al. 2004). Cette voie d'assimilation est la plus répandue mais d'autres existent, telles la voie des sérines, ou le cycle des acides tricarboxyliques inversé ('reverse TCA', une variante du cycle de Krebs).

La production primaire est principalement assurée par des bactéries utilisant les formes réduites du soufre comme source d'énergie, et formant souvent de spectaculaires biofilms visibles à l'œil nu (*Thiotrix*, *Beggiatoa*, surtout des Gamma, Beta et Epsilon protéobactéries). Les bactéries oxydant les métaux (fer, manganèse) abondants sur les sources hydrothermales, sont aussi autotrophes (*Galionella*, *Leptothrix*, *Sphaerotilus*, voir 2.7.1.3) (Nealson 1997).

Les bactéries méthanotrophes, dont l'importance dans le cycle du carbone est capitale au niveau des sites de fluides froids, sont un cas particulier : on ne peut les qualifier de 'producteurs primaires' que dans la mesure où le méthane utilisé est d'origine thermogénique.

2.7.1.1.3 - Carbone organique

Les molécules organiques sont une source d'alimentation à la fois pour les bactéries et archées hétérotrophes (un métabolisme très répandu à la fois en contexte anaérobie et aérobie) mais aussi pour les animaux. Les réactions d'oxydo réduction qui s'opèrent sur ces molécules permettent d'accroître la biomasse (biosynthèse ou transformation des molécules), ou de fournir de l'énergie en rejetant du dioxyde de carbone ou par fermentation (Nealson 1997). Par ailleurs, de nombreux procaryotes qualifiés de 'méthylotrophes' sont capables d'utiliser des composés monocarbonés partiellement oxydés (Anthony 1982).

2.7.1.2 - Cycle du soufre

En contexte de fluides froids, la principale source de sulfure de dihydrogène est la réduction des sulfates et du thiosulfate présents dans l'eau de mer par des delta protéobactéries hétérotrophes strictement anaérobies vivant dans le sédiment (Nealson 1997). Les donneurs d'électrons utilisés sont le dihydrogène ou diverses molécules organiques

(lactate, pyruvate...). Certaines de ces bactéries sont les partenaires des archées réalisant l'oxydation anaérobie du méthane (voir I-2.7.1.1.1), et leur activité couplée à l'AOM facilite la précipitation des croûtes carbonatées en contexte de fluides froids (Arvidson et al. 2004) (Sassen et al. 2004) (voir I-2.3.2). En contexte hydrothermal, les sulfures sont apportés par le fluide après lessivage des roches. Les précipités de sulfures métalliques sont à l'origine des cheminées, et de divers cristaux (framboisites de pyrite, gypse...) (Arvidson et al. 2004; Sassen et al. 2004). Certaines bactéries hydrothermales sont également capables de produire des filaments de sulfures inorganiques comme sur le site 9°N dans le Pacifique (Taylor and Wirsén 1997; Nelson 1998).

Le sulfure d'hydrogène peut être utilisé comme donneur d'électrons par une large diversité de procaryotes et notamment des protéobactéries aérobies ou utilisant le nitrate comme accepteur, et être oxydé jusqu'au sulfate en passant par divers intermédiaires dont le soufre élémentaire que certaines bactéries stockent dans des granules intracellulaires (Madigan et al. 2002) (Fig. 1.10). Nombre de ces procaryotes sont par ailleurs autotrophes, forment des biofilms sur le fond ou les surfaces libres, et assurent l'oxydation de la presque totalité des sulfures dans les couches supérieures du sédiment (epsilon protéobactéries, *Thioploca*, *Beggiatoa*...) (Nealson 1997; Nelson 1998; López-García et al. 2003). Les sulfates ainsi produits, ou ceux dissous dans l'eau de mer, sont la voie d'entrée du soufre dans le métabolisme cellulaire, le soufre étant un constituant de certains acides aminés (Madigan et al. 2002).

2.7.1.3 - Cycle des métaux

Les métaux jouent un rôle dans la formation des cheminées hydrothermales (voir I-2.4.2), mais peuvent également être utilisés par une diversité de procaryotes, notamment des beta et gamma protéobactéries autotrophes oxydant fer et manganèse (*Gallionella*, *Leptothrix*, *Sphaerotilus*...). Ces bactéries catalysent la précipitation d'oxydes par exemple dans une gaine extracellulaire (Nealson 1997; Emerson and Moyer 2002). La réduction des ions Fe^{3+} ou Mn^{4+} en conditions anaérobies est possible, mais dans ces environnements elle est d'une importance limitée, car de tels composés oxydés sont rares dans les zones de l'écosystème où l'anaérobiose domine (Madigan et al. 2002).

2.7.1.4 – Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote dans les environnements chimiosynthétiques est peu connu, mais on pense qu'il est complet au moins sur les sources hydrothermales (Mehta et al. 2003). Des approches de biologie moléculaire ont en effet mis en évidence la présence de bactéries possédant par exemple le gène codant la nitrite réductase (qui catalyse la transformation du

nitrite en ammonium) (Braker et al. 2000) et la nitrogénase (qui catalyse la transformation du diazote en ammonium) (Mehta et al. 2003). Par ailleurs, de nombreuses bactéries utilisent le nitrate comme accepteur d'électrons en l'absence d'oxygène grâce à la nitrate réductase (catalysant la transformation du nitrate en nitrite) (Nealson 1997). L'oxydation anaérobie de l'ammonium, un phénomène mis en évidence récemment chez certaines planctomycètes semble aussi opérer dans le sédiment au voisinage de certains environnements de fluides froids comme à Skagerrak (Dalsgaard et al. 2005).

2.7.1.5 - Hydrogène

Le rôle du dihydrogène comme donneur d'électrons est connu, quoique peu documenté dans les environnements chimiosynthétiques, dans lesquels il doit cependant être important (Jannasch and Mottl 1985). Il est aussi nécessaire à l'activité des monooxygénases (méthane, ammonium), ou de la méthanogenèse (Nealson 1997). Enfin, le dihydrogène est considéré comme un composé permettant la survie à long terme des formes de résistances bactériennes en environnements extrêmes, en limitant par exemple la dépurination de l'ADN ou la racémisation des acides aminés (Morita 2000). Le dihydrogène est produit par de nombreux procaryotes par fermentation ou par le biais d'hydrogénases intra ou extracellulaires (Morita 2000), mais est aussi très abondant dans les fluides hydrothermaux en contexte de substrat ultrabasique, comme sur le site Rainbow (Desbruyères et al. 2000).

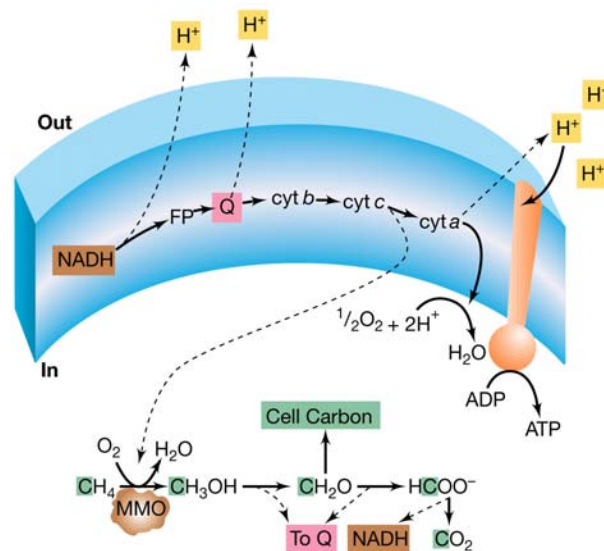


Fig. 1.9 : Oxydation du méthane par les bactéries méthanotrophes. Le méthane est converti en méthanol par le méthane mono oxygénase (MMO) à l'aide d'électrons issus du cytochrome c. Les électrons obtenus au cours des étapes suivantes alimentent la chaîne de transport qui maintient la force proton-motrice. L'essentiel du carbone utilisé pour la biosynthèse provient du formaldéhyde (CH₂O). Q : quinone, cyt : cytochrome. Schéma extrait de Madigan et al. 2002.

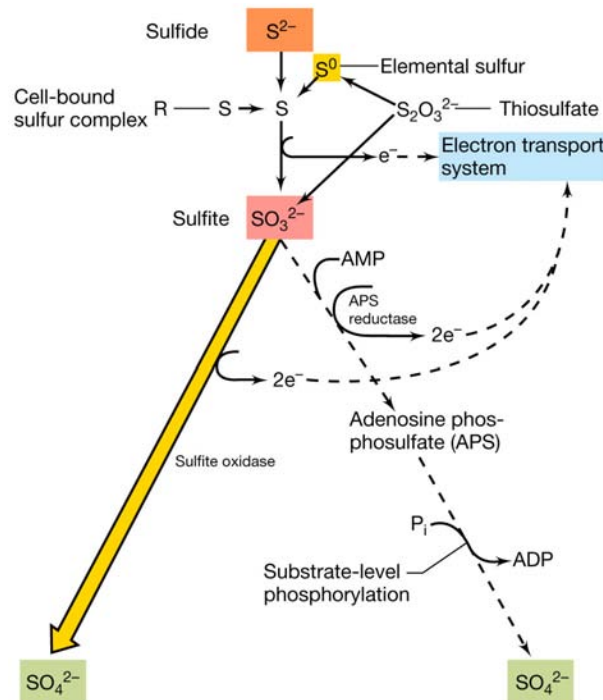


Fig. 1.10 : Oxidation des composés réduits contenant du soufre. La voie utilisant la sulfite réductase est souvent majoritaire. Les électrons récupérés alimentent une chaîne de transport d'électrons qui génère une force proton-motrice. Schéma extrait de Madigan et al. 2002.

2.7.2 – Eucaryotes unicellulaires et métazoaires

Si les métazoaires de grande taille et, à l'autre extrême de l'échelle, les procaryotes ont fait l'objet d'un intérêt particulier, les eucaryotes unicellulaires et la méiofaune sont nettement moins connus (Robinson et al. 2004), probablement à cause de l'inadéquation des méthodes et stratégies d'échantillonnage et de la difficulté à identifier les représentants de ces groupes. Les foraminifères de la baie de Monterey ont été étudiés (Bernhard et al. 2000; Bernhardt et al. 2001) de même que les euglénozoaires (Buck et al. 2000), et l'utilisation de marqueurs moléculaires tels l'ARNr 18S a permis de démontrer par exemple l'existence d'une communauté de protistes particuliers dominée par des alvéolés sur le site hydrothermal Rainbow (MAR) (López-García et al. 2003). Il convient néanmoins de constater que l'essentiel des connaissances portent sur les métazoaires composant la mégafaune.

2.7.2.1 – Particularités physico-chimiques des environnements abritant des écosystèmes à base chimiosynthétique

Les environnements abritant des écosystèmes à base chimiosynthétique contrastent avec le reste de l'océan profond, et posent des problèmes uniques aux eucaryotes qui les peuplent. La température des fluides hydrothermaux, la variabilité spatio-temporelle et

l'hypoxie de l'environnement liées à l'apport de fluides et à leur utilisation par les microorganismes (Johnson et al. 1986; Fisher et al. 1988; Desbruyères et al. 2001; Tryon et al. 2002; Levin et al. 2003; Tunnicliffe et al. 2003; Helly and Levin 2004), l'abondance (Sarradin et al. 1999) et la toxicité des sulfures se fixant compétitivement sur les pigments respiratoires des métazoaires (Scott and Fisher 1995; Rothschild and Mancinelli 2001) ou inhibant la chaîne membranaire des mitochondries (Council 1979), ou encore la présence de saumures anoxiques et hypersalines sur les sites de fluides froids (MacDonald et al. 1990) constituent des stress particuliers auxquels les eucaryotes ont du s'adapter.

2.7.2.2 – Diversité, abondance et distribution des communautés de métazoaires

Le succès des organismes peuplant les environnements réduits est attesté par les biomasses considérables qu'ils y atteignent (Sibuet et al. 1988), et qui ont fait qualifier ces environnements d'oasis sous marines, tant ils en présentent les caractères : abondance très localisée d'une ressource, colonisation par un biota spécialisé souvent endémique, et persistance propre à ces systèmes (Carney 1994). La diversité spécifique est néanmoins très inférieure à celle de l'océan profond avoisinant pour une surface donnée (Grassle and Maciolek 1992).

La composition taxonomique et la distribution de la faune sur un site sont influencées par divers paramètres, tels que la nature des substrats, plus généralement durs en contexte hydrothermal et mixtes (sédimentaires avec éventuellement des croûtes carbonatées) en contexte de fluides froids (Tunnicliffe et al. 2003). Des paramètres tels que la chimie, la température, la distribution des sorties de fluides et les flux (MacDonald et al. 1989; MacDonald et al. 1990; Olu et al. 1997; Sarrazin et al. 1997), mais aussi la profondeur des sites (Olu et al. 1997; Maas et al. 1999) sont également importants. Le caractère discontinu dans l'espace et le temps de la distribution des sites impose également des adaptations pour assurer la dispersion des larves (Tunnicliffe et al. 1997; Desbruyères et al. 2000; Pradillon et al. 2001).

La mégafaune est composée d'espèces souvent caractéristiques d'un site, mais appartenant à des taxons d'ordre supérieur trouvés à la fois en contexte de fluides froids et en contexte hydrothermal (Sibuet and Olu 1998). Ces deux types d'environnements abritent donc des faunes alliées, formant un ensemble dont la distribution pourrait être mondiale (Gage and Tyler 1991). Cependant, probablement à cause de leur plus grande longévité des sites, de la moindre toxicité des fluides, et de la diversité des substrats, la richesse spécifique est probablement supérieure au niveau des sites de fluides froids (Sibuet and Olu 1998).

Cette mégafaune inclut quelques organismes de la faune abyssale, ubiquistes opportunistes, qui profitent de la biomasse de proies potentielles (Juniper and Sibuet 1987; Sibuet et al. 1988; Sibuet and Olu 1998). Des organismes inféodés aux environnements de fluides (quelques gastéropodes, crabes bythograéidés (Tunnicliffe et al. 2003) et galathéidés (Gage and Tyler 1991)), quelques rares échinodermes, certains téléostéens (famille des zoarcidés)) sont également présents. Mais l'originalité des environnements profonds abritant des écosystèmes à base chimiosynthétique est la richesse et la dominance, en terme de biomasse, de métazoaires associés à des bactéries symbiotiques chimiotrophes principalement sulfoxydantes ou méthanotrophes. Ces métazoaires symbiotiques représentaient 64 des 211 espèces décrites au niveau des sites de fluides froids en 1998, et jusqu'à 15 espèces distinctes sur un même site (Sibuet and Olu 1998). Les biomasses atteignent 20 à 30 kilogrammes par mètre carré (poids frais) pour les vésicomysidés de sites de fluides froids (Hashimoto et al. 1989) ou 70 kilogrammes par mètre carré pour le myilidé *Bathymodiolus puteoserpentis* sur le site hydrothermal de Logatchev (MAR) (Gebruk et al. 2000). Sur le site de la Brabade, la biomasse en poids frais atteint 21 kilogrammes par mètre carré pour *Bathymodiolus* aff. *childressii* (Olu et al. 1996). Cette faune forme la base d'une chaîne alimentaire parallèle à celle découlant de l'activité photosynthétique de surface (Olu et al. 1996). Elle est pratiquement absente des sites situés à moins de 400 mètres de profondeur, vraisemblablement éliminée compétitivement par les espèces de la zone euphotique continentale (Carney 1994). L'aspect 'primitif' de certains métazoaires comme les gastéropodes ou les cirripèdes (Yamaguchi et al. 2004) a fait suggérer un temps que ces faunes étaient des reliques des temps anciens, une idée abandonnée suite aux travaux de spécialistes de l'évolution (revue dans (Little and Vrijenhoek 2003)).

L'importance de la symbiose dans le développement et l'écologie des communautés de métazoaires peuplant les environnements à base chimiosynthétique implique que la compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes passe par l'étude des symbioses des invertébrés dominants, qui en sont à la fois la base, et les représentants les plus originaux.

Chapitre II – Etat de l’art et cadre de l’étude

1 – Découverte des métazoaires associés à des bactéries symbiotiques dans les environnements de fluides et questions

L’analyse isotopique, la microscopie électronique et l’analyse biochimique ont permis dès le début des années 80 de démontrer l’implication de bactéries chimioautotrophes sulfoxydantes dans la nutrition des grands métazoaires récoltés lors des premières campagnes sur les sources hydrothermales (Rau and Hedges 1979; Felbeck et al. 1981; Southward et al. 1981; Fiala-Médioni 1984), ou de fluides froids (Paull et al. 1984; Juniper and Sibuet 1987). Des symbioses méthanotrophes ont par la suite été identifiées chez les pogonophores (Southward et al. 1981), certains mytilidés (Cavanaugh et al. 1987) (Childress et al. 1986), et les éponges cladorhizes qui restent peu étudiées (Vacelet et al. 1995). La recherche de symbiose chez des métazoaires apparentés, vivant en dehors de ces environnements, a conduit à l’identification de nombreuses symbioses associées à des organismes du sédiment littoral et profond (revus dans (Fisher 1990)).

Les bactéries impliquées dans ces symbioses sont essentiellement des gamma protéobactéries (Fig. 2.1) plus ou moins apparentées à des bactéries libres présentes à la surface ou dans le sédiment de ces environnements (Cavanaugh et al. 2005; Stewart et al. 2005). A ce jour, aucun symbiote chimiotrophe n’a pu être isolé en culture pure, malgré le succès de quelques tentatives d’enrichissements (Nelson et al. 1995; Campbell et al. 2001). Le développement de techniques d’étude indirectes telles la biologie moléculaire a néanmoins permis de mener de nombreuses études dont les résultats nous renseignent sur divers aspects de ces symbioses, parmi lesquels leur diversité, leur fonctionnement, leur écologie et leur évolution (récapitulées dans la Fig. 2.2).

Malgré ces progrès, de nombreuses questions demeurent sans réponse, comme par exemple le mécanisme de reconnaissance entre hôtes et symbiotes, le degré de dépendance des symbiotes à l’égard de leurs hôtes, l’éventuelle réduction de la taille des génomes bactériens, ou encore les modalités de transmission des symbiotes, leur biogéographie, et l’éventuelle présence de formes libres dans l’environnement. Par ailleurs, l’influence réciproque s’exerçant entre les métazoaires, leurs bactéries et l’environnement est encore très mal comprise car chaque composant de ce système est mal connu. Enfin, l’essentiel des recherches a porté sur un nombre très limité d’espèces de métazoaires utilisés comme

organismes ‘modèles’. Le tableau qui se dégage des connaissances actuelles est celui d’associations dont les modalités et le degré d’intégration sont très diversifiés, comme l’illustrent les quelques exemples présentés ci dessous.

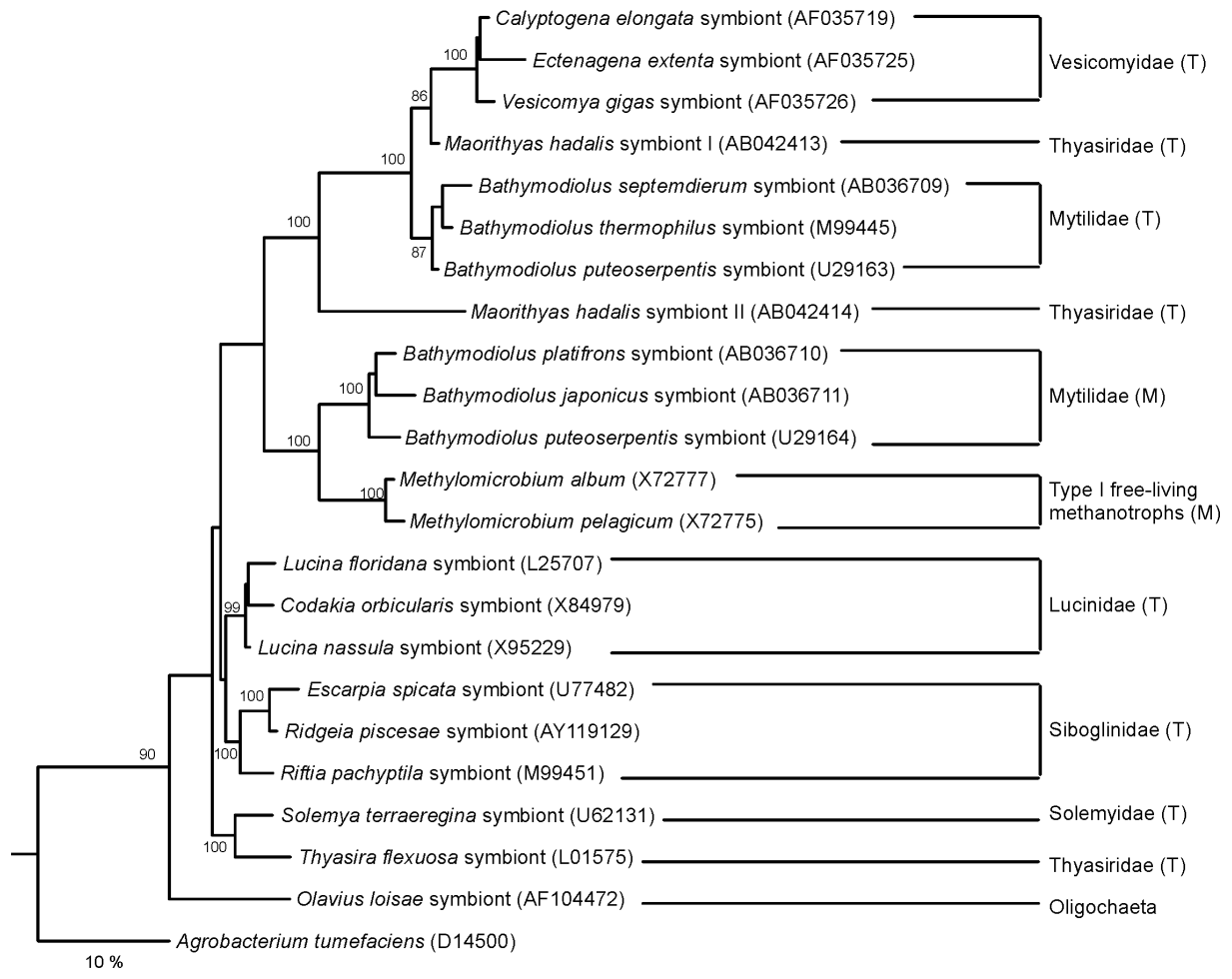
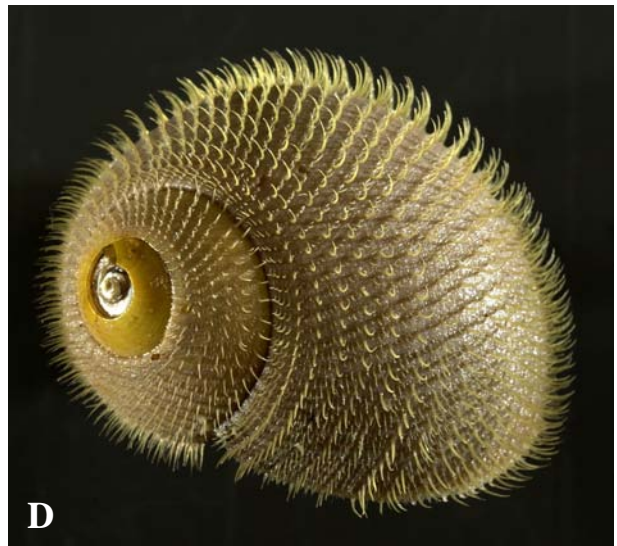
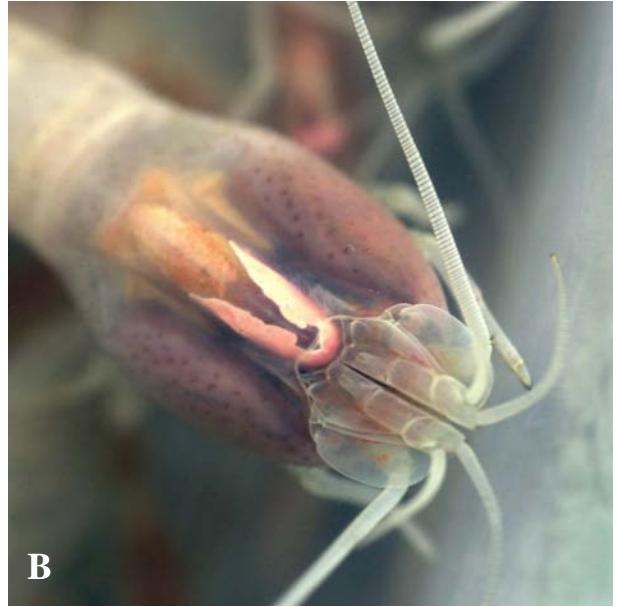


Fig. 2.1 : Arbre phylogénétique basé sur l’ARNr 16S figurant différents groupes de gamma protéobactéries symbiotiques associées à différents hôtes, ainsi que les bactéries libres méthanotrophes de type I. Symbiontes sulfoxydants (T) et méthanotrophes (M). Arbre calculé par la méthode ML (maximum likelihood) avec un modèle GTR (General Time Reversible) à partir d’un alignement de 1330 positions avec le logiciel TreeFinder (Jobb 2003). Log LN=-7743. Les valeurs de soutien correspondent à l’indice RELL (pourcentage d’arbres dans lesquels le nœud est présent parmi les 1000 arbres les plus vraisemblables). La barre d’échelle représente un taux estimé de 10% de substitution.

Hôte					Symbiontes				
Taxon	Occurrence	Habitat	Tube digestif	Types principaux	Métabolisme	Localisation	Position	Transmission	
Porifera	Cladorhizidae	<i>Cladorhiza</i> sp.	Volcans de boue		?	MOX		E	?
Annelida	Alvinellidae	<i>Alvinella</i>	Hydrothermal (Pacifique Est)	Présent	Epsilon Proteobacteria	SOX	cuticule	E	?
	Siboglinidae	Vestimentifères, pogonophores, <i>Osedax</i>	Hydrothermal, fluides froids, carcasse de baleine	Spécialisé (trophosome)	Gamma Proteobacteria	SOX, MOX	Trophosome, zone subannulaire	I	?
	Oligochaeta	<i>Inanidrilus, Olavius</i>	Sédiment	Absent	Gamma, alpha, delta Proteobacteria	SOX, SRB	subcuticule	I	?
Mollusca : Bivalvia	Thyasiridae	Tous	Sédiment (côtiers et fluides froids)	Réduit	Gamma Proteobacteria	SOX	branchie	I, E	?
	Lucinidae	Tous	Sédiment (côtiers et fluides froids)	Réduit	Gamma Proteobacteria	SOX	branchie	I	Env
	Solemyidae	Tous	Sédiment (côtiers et fluides froids)	Réduit	Gamma Proteobacteria	SOX	branchie	I	Ver ?
	Vesicomysidae	Tous	Sédiment (hydrothermal et fluides froids)	Réduit	Gamma Proteobacteria	SOX	branchie	I	Ver
	Mytilidae	Bathymodiolinae (<i>Bathymodiolus</i>)	Epibenthique (fluides froids, hydrothermal)	Plus ou moins réduit	Gamma Proteobacteria	SOX, MOX	branchie	I	Env (SOX)
Mollusca : Gastropoda	Provannidae	<i>Alviniconcha, Ifremeria</i>	Hydrothermal (Pacifique)	Présent	Gamma (<i>Ifremeria</i>), epsilon (<i>Alviniconcha</i>) Proteobacteria	SOX (MOX ?)	Branchie	I	Env
Arthropoda	Alvinocaridae	<i>Rimicaris</i>	Hydrothermal (Atlantique)	Présent	Epsilon Proteobacteria, Defferibacteres, <i>Spiroplasma, Geovibrio</i>	SOX (FeOX ?)	Chambre branchiale	E	?

Fig. 2.2 : caractéristiques de diverses symbioses impliquant des bactéries chimiotrophes. Métabolisme : sulfoxydant (SOX), méthanotrophe (MOX), fer oxydant (FeOX) ; Localisation : intracellulaire (I), extracellulaire (E) ; Transmission : environnementale (Env), verticale (Ver).



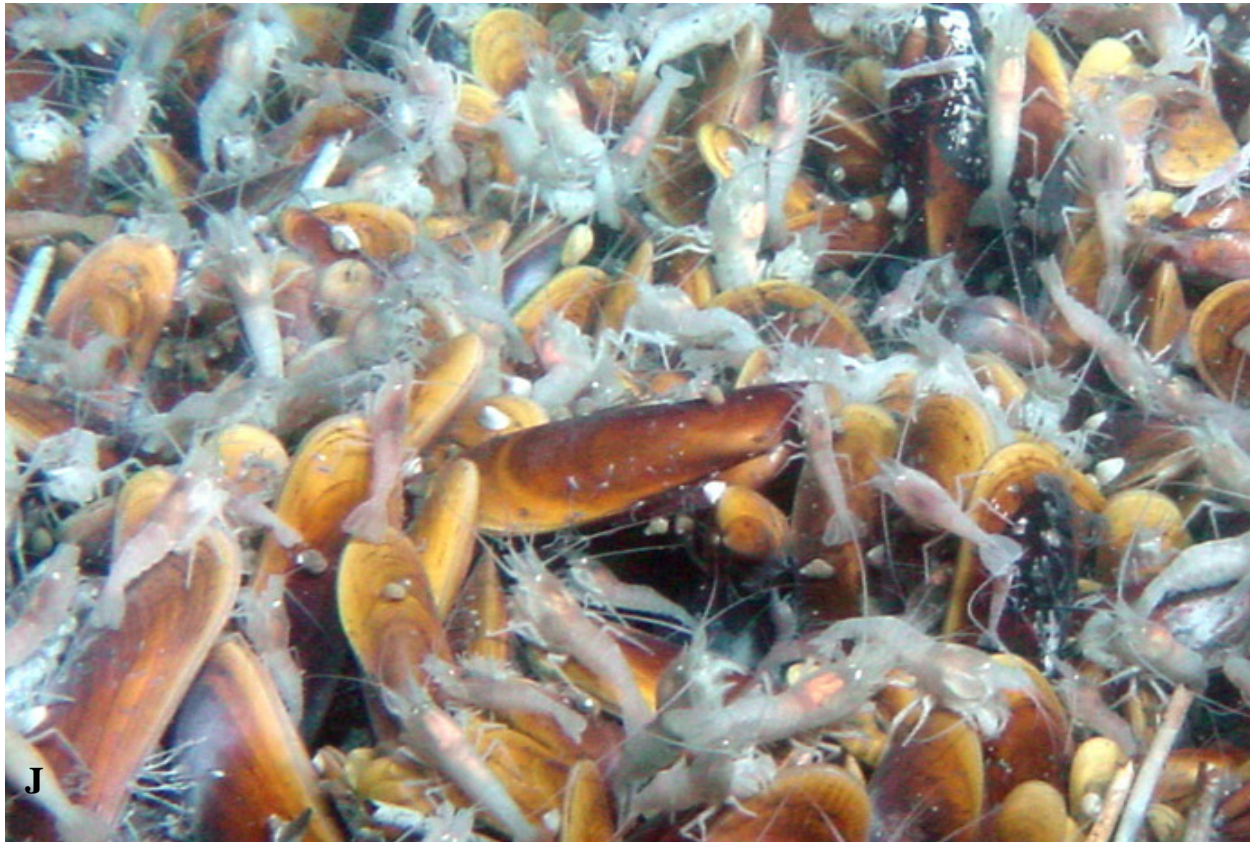


Fig. 2.3. : Morphologie externe de divers invertébrés associés à des bactéries symbiotiques. *A* : *Alvinella pompejana* (Ride du Pacifique oriental) ; *B* : *Rimicaris exoculata* (Ride Médio Atlantique) ; *C* : Vestimentifère (Pockmarks est Méditerranéens) ; *D* : *Alviniconcha hesslerii* (Sud Est Pacifique) ; *E* : *Thyasira flexuosa* (Thyasiridae) ; *F* : *Lucinoma kazanii* (Lucinidae, Méditerranée) ; *G* : *Acharax* sp. (Solemyidae, zone à nodules du Pacifique) ; *H*, *I* : *Calyptogena* sp. ? (Vesicomidae, site Régab, Golfe de Guinée) ; *J* : agrégat de *Bathymodiolus* sp. (Mytilidae) avec espèces accompagnatrices (crevettes alvinocaridae, gastéropodes (site Régab, Golfe de Guinée). Photos ©Ifremer.

2 – Quelques exemples d'associations symbiotiques

2.1 - Symbioses extracellulaires ou épibioses

2.1.1 - *Alvinella pompejana* (Annelida : Polychaeta : Alvinellidae), le ver de Pompeii

Cet annélide tubicole (Fig. 2.3A) d'une dizaine de centimètre occupe le pôle chaud des édifices hydrothermaux sur les sites du Pacifique oriental (revue générale dans Desbruyères et al. 1998; Tunnicliffe et al. 2003). Affrontant des gradients de température qui pourrait atteindre 84°C entre les deux extrémités de leur tube, ces polychètes ont développé des adaptations, notamment pour assurer la stabilité de leur ADN (Di Meo-Savoie et al. 2004), qui en font les métazoaires les plus thermotolérants, et l'une des espèces pionnières dans la colonisation des nouvelles sorties de fluide (Chevaldonné et al. 2000). Leur mode de reproduction est mal connu mais ils paraissent pouvoir se disperser à grande distance (Chevaldonné et al. 1997; Jollivet et al. 1999; Pradillon et al. 2001).

Tandis que le bouclier glandulaire ventral assure la sécrétion du tube, la région dorsale est tapissée de biofilms dominés par deux phylotypes d'épsilon proétobactéries qui colonisent également la paroi interne des tubes (Cary et al. 1997). Des enrichissements ont permis de déterminer que ces épibiontes sont modérément thermophiles (optimum de croissance à 45°C), sulfoxydantes (Campbell et al. 2001), et capables de fixer le carbone au moyen de la 'reverse TCA' (voir 2.7.1.1.2) (Campbell et al. 2003). L'échec des études antérieures à démontrer l'autotrophie par l'identification de la RuBisCO avait laissé penser que ces bactéries pouvaient être hétérotrophes, même si d'autres voies d'autotrophie sont connues (Campbell et al. 2001). Le reste de la communauté bactérienne associée à *A. pompejana* se compose de bactéries sulfato réductrices (Cottrell and Cary 1999), liées au cycle de l'azote (Jeanthon and Prieur 1990), et de spirochètes qui semblent fermenter les hydrocarbures disponibles (Campbell and Cary 2001). Un rôle de la microflore dans la détoxification des sulfures a été suggéré, mais une partie du soufre est néanmoins mobilisé sous la forme de sulfures de fer moins toxiques (Di Meo-Savoie et al. 2004). L'oxygène pouvant être rare dans le tube, il a été proposé que la plupart des bactéries avaient probablement un métabolisme anaérobie (Le Bris et al. 2003; Di Meo-Savoie et al. 2004), même si des résultats récents remettent en cause cette idée (Le Bris et al. 2005). Les modalités du transfert de carbone entre les symbiontes et leur hôte restent à élucider. D'autres polychètes, parmi lesquels *Alvinella caudata* et *Paralvinella palmiformis* présentent des symbioses assez similaires, quoique moins originales (Alain et al. 2002).

2.1.2 – *Rimicaris exoculata* (Arthropoda : Alvinocaridae)

R. exoculata, une crevette d'environ 5 centimètres (Fig. 2.3B), peuple exclusivement les sites hydrothermaux de la ride Médio Atlantique. Les individus se regroupent souvent en amas très denses sur les parois des cheminées hydrothermales, jusqu'à 50 individus par litre, parfois à la limite des sorties de fluides, qu'ils semblent capables de 'voir' grâce à un organe en V constitué de cellules photoréceptrices dérivées (Fig. 2.3B) captant le rayonnement infrarouge émis par le fluide (Van Dover et al. 1989). Cette interprétation est encore controversée (Segonzac et al. 1993). *R. exoculata* possède également des organites riches en mitochondries situés dans ses branchies, qui paraissent jouer un rôle dans la détoxification des sulfures (Compère et al. 2002).

Il a été suggéré que *R. exoculata* se nourrissait des tapis bactériens présents sur les surfaces minérales des cheminées (Van Dover et al. 1988), mais la présence d'une chambre branchiale hypertrophiée, ainsi que la réduction de l'estomac pourraient également suggérer qu'une nutrition symbiotique joue un rôle (Segonzac et al. 1993). La chambre branchiale abrite en effet une monoculture de bactéries épibiontes filamenteuses chimioautotrophes sulfoxydantes, similaires à celles peuplant les surfaces (Polz and Cavanaugh 1995). L'hôte cultiverait ces bactéries et les consommerait ('farming') (Segonzac et al. 1993; Rieley et al. 1999). La chambre branchiale présente une zonation liée au sens de circulation de l'eau, avec des dépôts d'oxydes métalliques qui suggèrent la présence probable de bactéries du fer (Zbinden et al. 2005). La mue propre aux crustacés pose des problèmes inédits en terme de symbiose, puisque la cuticule doit être recolonisée, par un mécanisme encore indéterminé, après chaque événement. Le tube digestif abrite quant à lui une microflore spécifique composée d'au moins 7 phylotypes distincts, principalement des epsilon protéobactéries, des entomoplasmatales (apparentées à des symbiontes d'insectes), des defferibactères (qui métabolisent les métaux, donc ici vraisemblablement 'fer réductrices'), des *Spiroplasma* et des *Geovibrio* (Zbinden and Cambon-Bonavita 2003). Le rôle nutritionnel de cette microflore est probable (Pond et al. 1997; Polz et al. 1998), comm l'indique la présence de bactéries sur les pièces buccales (Zbinden et al. 2005).

2.2 - Symbioses intracellulaires

2.2.1 – *Inanidrilus* et *Olavius* (Annelida : Oligocheata)

Les oligochètes des genres *Inanidrilus* et *Olavius*, dépourvus de tube digestif et d'organes excréteurs, vivent à l'interface oxique/anoxique du sédiment, notamment dans les récifs coralliens, ou en domaine de marges continentales associées à des fluides froids

(Blazejak et al. 2005). Ils s'associent à une microflore sulfoxydante et autotrophe (Felbeck et al. 1983; Krieger et al. 2000), composée de plusieurs phylotypes bactériens (Dubilier et al. 1995; Dubilier et al. 1999). L'inventaire moléculaire de cette microflore a montré la diversité des bactéries impliquées chez *O. algarvensis* (Dubilier et al. 2001) et *O. crassitunicatus* (Blazejak et al. 2005). Cette diversité inclut des delta, alpha, gamma protéobactéries et des spirochetes. Certaines sont impliquées dans le cycle du soufre, et la coexistence de bactéries sulfoxydantes et sulfato réductrices, séparées dans l'espace, explique pourquoi ces oligochètes peuvent survivre à l'interface oxygène anoxique en bouclant le cycle du soufre (Blazejak et al. 2005). Les relations complexes existant entre les différentes bactéries et l'hôte aboutissent en outre à des phénomènes de syntrophie. Ainsi, en conditions anaérobies, les bactéries sulfato réductrices pourraient recycler les composés non excrétés par l'hôte, produisant le sulfure de dihydrogène nécessaire aux sulfoxydantes pour assurer la production primaire (Dubilier 2004).

2.2.2 – Vestimentifères et pogonophores (Annelida : Siboglinidae)

Parmi les habitants 'emblématiques' des écosystèmes chimiosynthétiques, l'annélide siboglinidé *Riftia pachyptila* qui atteint 2 à 3 mètres, vit dans un tube de chitine, et peuple les sources hydrothermales du Pacifique oriental. Les individus forment des bouquets au voisinage des sorties de fluide. Le corps de ce métazoaire très spécialisé est formé dans sa partie antérieure d'une branchie rouge assurant les fonctions d'échanges avec l'extérieur, puis d'un vestimentum musculueux, d'un trophosome, et d'un opisthosome dans sa partie postérieure (Van Dover 2000).

Dépourvu de tube digestif, de bouche, et d'anus à l'état adulte (ceux-ci disparaissant au cours du développement) (Felbeck et al. 1981), la nutrition est assurée par des gamma protéobactéries sulfoxydantes autotrophes peuplant le trophosome, un organe d'origine coelomique très vascularisé (Stahl et al. 1984; Distel et al. 1988).

Les aspects biochimiques de cette association sont revus dans Minic and Hervé 2004. Les sulfures nécessaires aux bactéries sont assimilés au niveau de la branchie. Leur toxicité, notamment leur liaison compétitive au site de fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine, est contournée par l'utilisation d'hémoglobines octamériques dotées de sites spécifiques de fixation des sulfures à l'aide d'ions zinc (Flores et al. 2005). Ces hémoglobines séquestrent et transportent l' H_2S jusqu'au trophosome. Lors de son oxydation par les bactéries, des granules de soufre élémentaire sont formés (Pflugfelder et al. 2005).

L'énergie libérée par l'oxydation des sulfures permet aux bactéries de fixer le carbone, transporté sous forme de CO_2 dissous ou d'ion bicarbonate HCO_3^- , en utilisant le cycle de

Calvin et une RuBisCO de type II (voir I.2.7.1.1.2) (Robinson et al. 1998). Ce carbone est ensuite transféré massivement et rapidement vers l'hôte, soit directement, soit par la digestion des bactéries (Bright et al. 2000). L'efficacité de ces processus garantit la croissance rapide de l'hôte, lui permettant d'atteindre des tailles et des biomasses importantes (Fisher et al. 1997). Outre le carbone, les symbiotes fournissent également l'azote (Lee and Childress 1994) (Lee et al. 1999). L'intérieur des tubes abrite une communauté bactérienne diversifiée, dominée par les epsilon protéobactéries, très différente de la microflore symbiotique, et dont le rôle nutritionnel est inconnu (López-García et al. 2002).

En dépit de la proximité phylogénétique des symbiotes associés à différents siboglinidés (Di Meo et al. 2000) (Fig. 2.1), la co-évolution hôte-symbiote et la transmission verticale n'ont jamais été démontrées (Feldman et al. 1997; McMullin et al. 2003). La reproduction est peu connue, mais les larves de vestimentifères pourraient être dispersées à des centaines de kilomètres (Marsh et al. 2001).

Les vestimentifères associés aux sources de fluides froids (Fig. 2.3C), notamment *Lamellibrachia*, présentent des originalités, parmi lesquelles la capacité d'absorber l'H₂S au niveau d'une extension du tube, sorte de racine, à travers le substrat dur (Julian et al. 1999; Freytag et al. 2001). Cette 'racine' a un rôle structurant pour le milieu car elle permet la circulation et l'introduction du sulfate, dissous dans l'eau de mer, jusque dans le sédiment, favorisant le processus de sulfato réduction (Boetius 2005; Cordes et al. 2005). La croissance de ces vestimentifères est plus lente que celle de leurs cousins hydrothermaux, mais leur longévité pourrait atteindre 100 à 200 ans (Fisher et al. 1997). Certains sont en outre associés à une plus large diversité de bactéries (alpha, gamma, epsilon protéobactéries) (Kimura et al. 2003).

Le second groupe d'annélides sigoglinidés est constitué par les pogonophores, des vers tubicoles fins et allongés peuplant les environnements chimiosynthétiques, mais aussi des sites tels que les fjords ou les pentes continentales. Ils sont associés à des bactéries méthanotrophes (Nelson and Fisher 1995), ou à des sulfoxydantes (*Oligobrachia mashikoi* (Kimura et al. 2003)), ou de manière exceptionnelle aux deux (Schmaljohann et al. 1990). Enfin, un nouveau type de symbiose permettant probablement l'obtention de matière organique en provenance de tissus en décomposition a récemment été identifiée chez le siboglinidé *Osedax* vivant sur les squelettes de baleine (Goffredi et al. 2005).

2.2.3 – *Alviniconcha* et *Ifremeria* (Mollusca : Gastropoda : Provannidae)

Les gastéropodes *Ifremeria nautilei* et *Alviniconcha* spp. (Fig. 2.3D) (appartenant probablement à trois espèces (Kojima et al. 2001)) dominant certains sites hydrothermaux du

sud ouest Pacifique (Bassin de Lau, de Manus, North Fiji, fosse des Mariannes) (Jollivet and cruise 1989). Ils abritent des bactéries symbiotiques (Kojima et al. 2001). Chez *I. nautili*, les gamma protéobactéries sulfoxydantes sont localisées à l'intérieur de vacuoles accumulées dans des bactériocytes situés dans une cténié surdéveloppée dont les ouvertures vers l'extérieur suggèrent qu'il s'agit d'un stade intermédiaire entre symbiose extra et intracellulaire (Windoffer and Giere 1997; Urakawa et al. 2005). Certains spécimens du bassin de Manus semblent également abriter des méthanotrophes actifs (Galchenko et al. 1992). Les symbiotes d'*A. hesslerii* sont des epsilon protéobactéries probablement liées au cycle du soufre (Urakawa et al. 2005), et dont certaines utilisent le cycle 'TCA reverse' pour la fixation de carbone (Suzuki et al. 2005). C'est la première fois que des membres de ce groupe sont identifiés comme symbiotes intracellulaires. Ces symbiotes sont à la base de la nutrition d'*A. hesslerii*, tandis qu'*I. nautili* semblerait avoir un régime plutôt mixotrophe (Pranal et al. 1996).

La variabilité (présence/absence de méthanotrophes selon les sites, types de symbiotes), la distance phylogénétique entre les bactéries associées à ces espèces proches, et la présence d'ouvertures au niveau de la cténié suggèrent une transmission environnementale (Galchenko et al. 1992; Windoffer and Giere 1997; Urakawa et al. 2005).

D'autres types de symbiose existent chez les gastéropodes, notamment l'association de gamma protéobactéries sulfoxydantes avec la glande oesophagique hypertrophiée de *Neomphalina* (famille des peltospiridés) (Goffredi et al. 2004), un gastéropode caractérisé par ailleurs par son pied couvert de plaques de sulfures de fer formées par des communautés diverses d'épibiontes (Wàren et al. 2003; Goffredi et al. 2004)

2.2.4 - Bivalves

On connaît actuellement cinq familles de bivalves associées à des bactéries symbiotiques localisées dans les branchies. Ces symbioses ont un degré d'intégration intermédiaire entre les symbioses extracellulaire et la symbiose très intégrée rencontrée par exemple chez *Riftia pachyptila* (Fig. 2.2). En effet si les palpes labiaux sont réduits, le tube digestif plus ou moins réduit reste fonctionnel, de même que subsiste la capacité de filtration par les branchies (Gustafson and Reid 1988; Fisher 1990; Page et al. 1991; Gustafson et al. 1998).

2.2.4.1 - Thyasiridae

Les thyasiridés (Fig. 2.3E) sont des bivalves de petite taille à la coquille triangulaire portant un sillon caractéristique dans la partie postérieure. Ils peuplent les sédiments marins profonds et côtiers, et les zones de fluides froids (Parker 1982; Gebruk et al. 2000). Ils sont

associés à des gamma protéobactéries symbiotiques sulfoxydantes appartenées aux symbiontes des bivalves lucinidés et des vestimentifères (Distel and Wood 1992). Les symbioses sont généralement extracellulaires (Southward 1986) mais un exemple de symbiose intracellulaire est connu chez *Maorithyas hadalis*, le bivalve le plus profond chez qui une symbiose a été identifiée (7300m). Cette espèce est associée à une bactérie symbiotique apparentée aux symbiontes des mytilidés (Fig. 2.1), et à une bactérie symbiotique proche des *Thiomicrospira* (Fujiwara et al. 2001). La fixation des sulfures se fait au niveau du pied hyperextensible, capable de s'allonger jusqu'à 30 fois pour atteindre les zones riches dans le sédiment (Dufour and Felbeck 2003).

2.2.4.2 - Lucinidae

Les représentants de cette famille (Fig. 2.3F) peuplent les écosystèmes chimiosynthétiques profonds (notamment en contexte de fluides froids), mais aussi certains sédiments côtiers en zone tropicale (Parker 1982; Sibuet and Olu 1998; Salas and Woodside 2002). Les lucinidés étant des espèces endogées, elles ne sont pas présentes sur les substrats basaltiques des dorsales (Tunnicliffe et al. 2003). Tous les lucinidés étudiés sont associés à des bactéries sulfoxydantes (Felbeck et al. 1981; Berg and Alatalo 1984; Anderson 1995; Arndt et al. 2001).

Contrairement à ce qui est constaté chez la plupart des autres bactéries symbiotiques, les symbiontes de *Lucinoma aequizonata* n'utilisent pas l'oxygène comme accepteur d'électrons pour leur respiration, mais le nitrate, ce qui limite la compétition entre bactéries et hôte pour l'accès à l'oxygène, rare dans le sédiment (Hentschel and Felbeck 1995). Cette respiration anaérobie est une adaptation isolée à l'environnement, puisque les symbiontes de *Codakia orbicularis* consomment l'oxygène qui est abondant dans l'habitat particulier de cette espèce (Duplessis et al. 2004).

Les bactéries symbiotiques des lucinidés forment un groupe monophylétique à l'intérieur des gamma protéobactéries (Fig. 2.1) (Durand et al. 1996), et un même phylotype d'ARNr 16S peut être partagé entre différentes espèces d'un même environnement (Durand and Gros 1996). La possibilité de maintenir certains lucinidés en aquarium, comme *Codakia orbicularis*, a permis de mener des expériences qui ont montré que les symbiontes sont transmis par l'environnement à des juvéniles aposymbiotiques. Cette transmission environnementale, ainsi que la découverte de l'abondance des formes libres des bactéries symbiotiques dans certains herbiers à *Thalassia testudinum* (Gros et al. 1996), ont conduit à émettre l'hypothèse que l'apparition de ces symbioses chez les lucinidés est récente (Gros et al. 2003). Les bactéries semblent néanmoins tirer un bénéfice de l'association, puisqu'elles

sont environ cinq fois plus volumineuses lorsqu'elles sont à l'intérieur des branchies de l'hôte (Gros et al. 2003).

2.2.4.3 - Solemyidae

Cette famille primitive qui est apparue au paléozoïque (Fig. 2.3G), il y a environ 450 millions d'années (Pojeta 1988), regroupe des bivalves vivant dans les zones côtières (sédiment, herbiers en zones tempérées et tropicales) et dans les écosystèmes chimiosynthétiques profonds (principalement de fluides froids) (Parker 1982; Tunnicliffe et al. 2003). Ces bivalves vivent enfouis dans des tubes en Y ou en U. Leur tractus digestif et leurs palpes labiaux sont réduits. Leurs branchies hypertrophiées abritent des bactéries oxydant les sulfures et le thiosulfate (Anderson et al. 1987; Gustafson and Reid 1988; Fisher 1990).

La fixation de carbone est assurée par une RuBisCO de type I (voir I-2.5.1.1.2) (Cavanaugh 1983) dont l'opéron unique a été cloné et exprimé *in clone* chez *E. coli*. Outre les gènes codant pour les deux sous-unités (cbbL et cbbS), cet opéron comprend divers gènes régulant l'expression post transcriptionnelle (cbbQ, cbbO...) (Schwedock et al. 2004).

Les sulfures peuvent se lier à une hémoglobine chez *Solemya reidi*, mais ce n'est pas le cas général. Les niveaux de taurine et thiotaurine, acides aminés libres qui permettent le stockage et le transport du soufre, augmentent après exposition à un niveau élevé de sulfures chez *S. velum*, cette augmentation n'est pas observée chez les bivalves non symbiotiques. La cystéine, précurseur de la taurine et thiotaurine, est fournie par les symbiontes, indice d'une réelle co-opération entre partenaires (Joyner et al. 2003). Les mitochondries des cellules interstitielles situées entre les bactériocytes peuvent oxyder les sulfures en thiosulfate, celui-ci étant métabolisé par les bactéries. (Sanders et al. 1998).

Les symbiontes sont des gamma protéobactéries apparentées aux symbiontes de vestimentifères et de lucinidés (Fig. 2.1) (Eisen et al. 1992). Leur ADN a été identifié dans le sperme, les oeufs et les larves par PCR, ce qui suggère une transmission verticale (Cary 1994), mais ces bactéries n'ont jamais été détectées par la méthode FISH et ne forment pas un groupe monophylétique (Krueger and Cavanaugh 1997), ce qui évoquerait plutôt des origines évolutives multiples et l'absence de co-spéciation entre hôtes et symbiontes. La co-existence observée dans certains habitats (herbiers) entre lucinidés et solemyidés, ainsi que la proximité phylogénétique entre symbiontes des deux familles a conduit à proposer l'hypothèse d'un changement d'hôte au cours de l'évolution des bactéries (Krueger and Cavanaugh 1997).

2.2.4.4 - *Vesicomysidae*

La famille des vesicomysidés (Fig. 2.3H, I), apparue au cénozoïque, regroupe environ 50 espèces de bivalves plus ou moins ovoïdes pouvant dépasser 20 centimètres dans leur plus grande largeur, inféodés aux écosystèmes à base chimiosynthétique, et vivant partiellement enfouis dans le sédiment (Parker 1982) à l'exception de *Calyptogena magnifica* qui s'est adapté à la vie dans les basaltes des dorsales. Les palpes labiaux et l'estomac sont très réduits, les cténidies très volumineuses. La distinction entre les genres *Calyptogena*, *Ectenagena* et *Vesicomys* est basée sur la morphologie, mais semble contredite par les données moléculaires (Vrijenhoek et al. 1994; Peek et al. 1997).

Ces bivalves sont tous associés à des gamma protéobactéries autotrophes sulfoxydantes. Les vésicomysidés vivent enfouis, partiellement ou à faible profondeur. Cette situation, à l'interface oxygène / anoxique, permet de répondre à la fois aux besoins en oxygène des bivalves, ainsi qu'à ceux des bactéries qui utilisent les sulfures, l'oxygène, et le carbone dissous (Felbeck et al. 1981; Cavanaugh 1983; Fiala-Médioni et al. 1993). La présence d'enzymes du cycle de Calvin (Felbeck et al. 1981) ainsi que la fixation autotrophe de CO₂ (Belkin et al. 1986) ont été démontrées peu après la découverte de ces bivalves près des sources hydrothermales.

Les sulfures sont absorbés au niveau du pied et transportés par une hémoglobine contenant du zinc (Childress et al. 1993; Zal et al. 2000). Des variations physiologiques existent dans la capacité de stockage et de transport des sulfures entre différentes espèces colonisant des environnements plus ou moins riches (Goffredi and Barry 2002). Dans des environnements pauvres en sulfures, les vésicomysidés sont capables de les concentrer de 5 à 60 fois dans leur cavité mantellique (Barry and Kochevar 1998) ; les branchies sont protégées par une sulfure oxydase (Goffredi and Barry 2002). Les symbiotes peuvent stocker le soufre élémentaire, divers polysulfures ainsi que des polythionates (Vetter 1985).

Les symbiotes sont transmis par voie maternelle, comme le prouve leur identification dans les oocytes primaires de *C. soyoae* (Endow and Ohta 1990) et les transferts horizontaux de bactéries, s'ils existent, sont extrêmement rares (Hurtado et al. 2003). Cette association obligatoire est à l'origine de l'accélération de l'évolution des séquences génomiques des symbiotes, provoquée par la dérive génétique liée aux 'bottlenecks', provenant du faible nombre de bactéries transmises d'une génération à l'autre (voir I.1.4.2) (Peek et al. 1998). Les vésicomysidés sont le seul groupe de métazoaires marins associés à des symbiotes chimioautotrophes (Fig. 2.1) dans lequel la co-évolution entre hôte et symbiotes a été démontrée (Peek et al. 1998).

3 - Les mytilidés symbiotiques

Comme les autres bivalves associés à des bactéries symbiotiques, les mytilidés du genre *Bathymodiolus* présentent un degré d'intégration intermédiaire entre l'épibiose et la symbiose intégrée telles celle rencontrée chez les vestimentifères (Fig. 2.2). En effet, même si les bactéries sont intracellulaires, localisées dans la partie apicale de cellules spécialisées de l'épithélium branchial, la branchie hypertrophiée conserve sa capacité à la filtration de particules (Page et al. 1991) et le tube digestif tout comme les palpes labiaux réduits, demeurent fonctionnels (Fisher 1990; Von Cosel 2002).

Deux types au moins de symbiontes chimiotrophes aux métabolismes distincts, sulfoxydant ou méthanotrophe, sont connus dans ce groupe et peuvent co-exister chez le même hôte. Ceci est une caractéristique originale par rapport à la plupart des autres métazoaires, et fait de la symbiose de *Bathymodiolus* un exemple intéressant d'association à trois partenaires. De nombreuses espèces de *Bathymodiolus* ont été identifiées sur différents sites hydrothermaux et de fluides froids aux caractéristiques géologiques, physiques et chimiques très variées. Les caractéristiques des symbioses chez différentes espèces sont récapitulées dans la Fig. 2.4. Ce groupe de mytilidés symbiotiques ubiquiste est donc un modèle intéressant pour les études comparatives portant sur l'écologie, la biogéographie et l'évolution des symbioses.

Les *Bathymodiolus* se démarquent par leur taille décimétrique (Fig. 2.3J), variable selon les espèces, mais pouvant atteindre 36 cm chez *B. boomerang* (Von Cosel and Olu 1998) (Fig. 2.3J). La forme de la coquille est variable, allant de courte et tumide, presque ovoïde, chez *B. childressii* (Gustafson et al. 1998), à très allongée chez *B. boomerang* (Von Cosel and Olu 1998).

3.1 – Taxonomie et distribution des mytilidés symbiotiques

Les moules symbiotiques peuplant les écosystèmes profonds à base chimiosynthétique appartiennent à la famille des mytilidés (Mollusca : Bivalvia : Pteriomorpha : Mytiloida : Mytilidae) qui comporte un total d'environ 250 espèces décrites (Bayne 1976), et à la sous-famille Bathymodiolinae dont l'espèce type est *Bathymodiolus thermophilus* Kenk & Wilson 1985 (Kenk and Wilson 1985). Au moins 26 espèces, dont environ une vingtaine décrites est connu (Von Cosel 2002; Von Cosel and Marshall 2003) et comm. pers.

La taxonomie des mytilidés est problématique : en l'absence de données moléculaires adéquates pour l'instant, elle est limitée par la faible variabilité des caractères morphologiques

(Distel 2000). Une classification des différentes espèces à l'intérieur du genre est proposée dans (Von Cosel 2002). Quelques études associant morphologie et phylogénie moléculaire commencent néanmoins à éclairer la structure du groupe, et à mettre en évidence l'existence d'espèces cryptiques (Jollivet et al. 1998; Maas et al. 1999; Smith et al. 2004). Certaines espèces (comme *B. boomerang*) sont controversées (Von Cosel, comm. pers.), et l'unité même du genre *Bathymodiolus* est largement discutée (Craddock et al. 1995; Gustafson et al. 1998). Ainsi, les petites moules du genre *Idas* peuplant certains sites de fluides froids ainsi que des carcasses de baleine ou des bois coulés (Distel et al. 2000) sont parfois interprétées comme des petites *Bathymodiolus* (Von Cosel, comm. pers.).

L'aire de répartition des *Bathymodiolus* et des genre proches *Idas*, *Gigantida*, *Tamu* couvre la plupart des océans, mais ces bivalves ne sont connus que écosystèmes chimiosynthétiques et principalement associés à des fluides. Ces mytilidés semblent cependant absents des sites situés à plus de 3600 mètres de profondeur (Sibuet and Olu 1998). Les mytilidés symbiotiques peuplent divers sites hydrothermaux de la ride médio Atlantique (*B. puteoserpentis* et *B. azoricus* (Von Cosel et al. 1999)), de la dorsale du Pacifique oriental (*B. thermophilus* (Kenk and Wilson 1985)), du Japon (*B. platifrons*, *B. japonicus*, *B. aduloides* (Hashimoto and Okutani 1994)), du sud ouest du Pacifique (*B. brevior* *B. elongatus* (Von Cosel et al. 1994) *Gigantidas gladius* (Von Cosel and Marshall 2003)), ou encore de l'océan indien (*B. marinsindicus* (Hashimoto 2001)). Ils abondent également dans divers sites de fluides froids du Golfe du Mexique (*B. childressii*, *B. heckerae*, *B. brooksii*, *Idas macdonaldii*, *Tamu fisherii* (Gustafson et al. 1998), *B. boomerang* (Olu et al. 1996; Von Cosel and Olu 1998) au niveau du prisme de la Barbade), du Japon (*B. platifrons*, *B. septemdiarium* (Hashimoto and Okutani 1994)), de Méditerranée (*Idas* (Olu-LeRoy et al. 2004)), ou du Golfe de Guinée (*B. sp. aff heckerae* (Von Cosel, comm. pers.)). Quelques espèces ont été décrites à partir d'échantillons récoltés par dragage sans que l'environnement ne soit caractérisé au large de la Mauritanie (*B. mauritanicus* (Von Cosel 2002)) et de la Nouvelle Zélande (*B. tangaroa* (Von Cosel and Marshall 2003)), leur présence laisant suspecter la présence de sources de fluides dans ces régions.

Zone	Espèce	Symbiontes	MET	Enzymes	ARNr 16S	FISH	Site	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Ride du Pacifique oriental (H)	<i>B. thermophilus</i> ²	S ^{1,5}	+ ^{1,35}	+ ^{7,19}	+ ⁸	-	Animal Farm ³⁵	-31.3	-3.7
							Rehu Marka ^{10,35}	-29.2	-3.5
							Rose Garden ⁹	-35.2	-4.2
Ride Médio Atlantique (H)	<i>B. azoricus</i> ²⁶	S > M ²⁸	+ ^{25,28,36}	+ ²⁸	+ ³²	-	Menez Gwen ^{27,28}	-23.5	-1.6
							Lucky Strike :Eiffel tower ^{27,28,36}	-30.3	-9.8
							Lucky Strike: Sintra ²⁷	-22.0	-4.5
							Rainbow ²⁷	-26.6	-
	<i>B. puteoserpentis</i> ²⁶	S > M ¹⁷	+ ^{31,11}	+ ^{23,31}	+ ^{17,32}	+ ¹⁷	Broken Spur ²⁷	-36.0	-
							Snake Pit ^{11,23,27}	-35.8	-10.7
							Logatchev ²⁷	-21.4	-
North Fiji	<i>B. brevior</i> ¹⁶	S ²¹	+ ²¹	-	+ ²¹	-	North Fiji ²¹	-33.3	-
Japon (H + F)	<i>B. japonicus</i> ¹⁵	M ²⁹	-	-	+ ²⁹	-	-	-	-
	<i>B. platifrons</i> ¹⁵	M ²⁹	-	-	+ ²⁹	-	-	-	-
Japon (H)	<i>B. septemdiernum</i> ¹⁵	S ²⁹	-	-	+ ²⁹	-	Mariana Through ²⁵	-37	-
Golfe du Mexique (F)	<i>B. heckerae</i> ²²	M > S ^{3,6,12}	+ ^{3,36}	+ ^{12,13}	-	-	Blake Ridge ³⁶	-56	-2
							Florida Escarpment ^{3,6,12,18}	-74.7	-
	<i>B. brooksii</i> ²²	M > S ¹³	+ ¹³	-	-	-	Alaminos Canyon ¹³	-48.5	-
	<i>B. childressi</i> ²²	M ^{7,14}	+ ⁷	+ ⁷	+ ¹⁴	+ ¹⁴	Brine Pool ^{30,33}	-64.7	-7.1
							Bush Hill ^{30,33}	-39.7	-7.3
Lousiana Slope ^{4,18}	-56.5	-							
Barbades (F)	<i>B. boomerang</i> ²⁴	M + S ? ²⁴	-	-	-	-	Barbados Acretionary Prism	-	-
Est Méditerranée	<i>Idas sp.</i> ³⁴	M + S ? ³⁴	+ ³⁴	-	-	-	Olimpi	-	-

Fig. 2.4 : Table regroupant les mytilidés dont les symbioses ont été étudiées, et les différents aspects de cette caractérisation : identification par microscopie électronique à transmission (MET), par tests enzymatiques, par séquençage de l'ARNr 16S des symbiontes, par FISH, et par analyse de la composition isotopique des tissus. Dans la colonne 'Zone', H signifie qu'il s'agit de sites hydrothermaux, et F de sites de fluides froids. Dans la colonne 'symbiontes', S correspond aux sulfoxydants et M aux méthanotrophes. Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ sont des moyennes des valeurs retenues dans les différents articles. Les exposants correspondent à une référence dans la liste suivante : ¹ Fiala-Médioni 1984, ² Kenk and Wilson 1985, ³ Paull et al. 1984, ⁴ Childress et al. 1986, ⁵ Fiala-Médioni et al. 1986, ⁶ Cavanaugh et al. 1987, ⁷ Fisher et al. 1987, ⁸ Distel et al. 1988, ⁹ Fisher et al. 1988, ¹⁰ Van Dover and Fry 1989, ¹¹ Cavanaugh et al. 1992, ¹² Cavanaugh 1993, ¹³ Fisher et al. 1993, ¹⁴ Distel and Cavanaugh 1994, ¹⁵ Hashimoto and Okutani 1994, ¹⁶ Von Cosel et al. 1994, ¹⁷ Distel et al. 1995, ¹⁸ Jahnke et al. 1995, ¹⁹ Nelson et al. 1995, ²⁰ Olu et al. 1996, ²¹ Dubilier et al. 1998, ²² Gustafson et al. 1998, ²³ Robinson et al. 1998, ²⁴ Von Cosel and Olu 1998, ²⁵ Trask and Van Dover 1999, ²⁶ Von Cosel et al. 1999, ²⁷ Colaco et al. 2002, ²⁸ Fiala-Médioni et al. 2002, ²⁹ Fujiwara et al. 2000, ³⁰ MacAvoy et al. 2002, ³¹ Pimenov et al. 2002, ³² Won et al. 2003, ³³ Dattagupta et al. 2004, ³⁴ Olu-LeRoy et al. 2004, ³⁵ Raulfs et al. 2004, ³⁶ Salerno et al. 2005

3.2 – Symbioses bactériennes des mytilidés

3.2.1 - Structures

La branchie des mytilidés est composée d'une succession de filaments, ciliés sur leurs faces frontales et latérales. Les bactéries sont localisées à l'intérieur de cellules spécialisées de l'épithélium branchial nommées bactériocytes (Fiala-Médioni et al. 1986; Cavanaugh et al. 1987). Elles occupent des vacuoles situées principalement dans la partie apicale de ces cellules, à proximité immédiate du fluide circulant dans la cavité mantellique (Fiala-Médioni et al. 1986; Fisher et al. 1987). La partie basale des bactériocytes est occupée par des structures, décrites comme des lysosomes, dont on suppose qu'ils jouent un rôle dans la digestion des bactéries, et dans le transfert de carbone entre symbionte et hôte (Fisher et al. 1987; Fiala-Médioni et al. 1990; Streams et al. 1997) (Fig. 2.5). Des estimations indirectes de la densité bactérienne par quantification de la quinone Q8 (Yamamoto et al. 2002) ou de certains lipides biomarqueurs (Pranal et al. 1997) ont abouti à proposer des densités comprises entre 10^{10} et 10^{11} bactéries par gramme de tissus branchial. Des observations microscopiques indiquent que le manteau abrite aussi des bactéries ressemblant aux symbiontes, mais en faibles quantités (Streams et al. 1997).

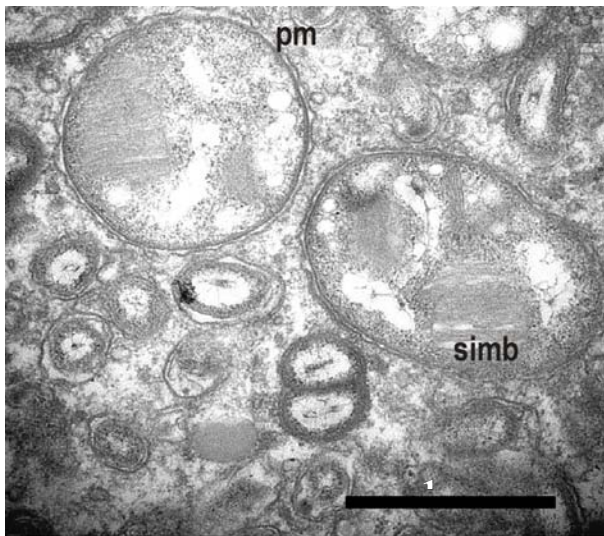


Fig. 2.5 : Bactéries symbiotiques méthanotrophes : grand morphotype présentant une membrane péribactérienne (pm) et des membranes empilées intracytoplasmiques (simb) ; bactéries sulfoxydantes : petit morphotype. Photo en microscopie électronique à transmission obtenue à partir d'une section transversale de branchie de *Bathymodiolus* sp. (Site Régab, Golfe de Guinée), réalisée par A. Fiala-Médioni (Duperron et al. 2005). La barre d'échelle représente 1 µm.

3.2.2 - Symbioses sulfoxydantes

Les premières études menées sur *B. thermophilus* (Cavanaugh 1983; Belkin et al. 1986) ont permis de montrer la présence de bactéries autotrophes (Fisher et al. 1987), dont on a démontré, à partir d'enrichissement, la capacité à utiliser sulfure et thiosulfate comme sources d'énergie (Nelson et al. 1995) malgré l'absence des granules de soufre trouvés dans les symbiontes d'autres métazoaires comme les vésicomydés (voir II.3.3.4.4) et les

vestmentifères (voir II.3.3.3) (Fisher 1990). La proximité des bactéries et du fluide limite le risque lié au transport des sulfures, et aucune adaptation particulière n'a jusqu'à présent été mise en évidence pour leur transport chez les mytilidés.

Ces bactéries, qui mesurent environ 0,5 µm (Fiala-Médioni 1984), utilisent une RuBisCO de forme I pour fixer le carbone par le cycle de Calvin (voir I.2.7.1.1.2) en conditions aérobies (Robinson and Cavanaugh 1995; Elsaied and Naganuma 2001). L'anaérobiose peut quant à elle entraîner la production de sulfures par ces symbiontes dans les tissus (Arndt et al. 2001).

3.2.3 - Symbioses méthanotrophes

Des bactéries méthanotrophes de taille plus conséquente, environ 1,5 µm de diamètre, ont été identifiées par microscopie dans les branchies de *B. heckeræ* à partir de leur morphologie très proche de celle des méthanotrophes de type I, caractérisés par la présence de membranes intracytoplasmiques empilées (Anthony 1982; Fisher 1990) (Fig. 2.5). La consommation de méthane par un fragment de branchie (Childress et al. 1986), la mesure d'une activité méthanol déshydrogénase (enzyme clé de la méthylotrophie, voir I.2.7.1.1.1) (Cavanaugh et al. 1987), ainsi que la croissance d'individus à partir du méthane comme seule source de carbone et d'énergie (Cary et al. 1988) ont confirmé l'hypothèse initiale d'une symbiose méthanotrophe. Le carbone fixé est rapidement transféré à l'hôte (Fisher et al. 1987; Fisher and Childress 1992; Streams et al. 1997), et la signature isotopique très négative du carbone dans les tissus, proche de celle du méthane biogénique (voir I.2.3.1), ne laisse aucun doute sur le rôle nutritionnel joué par ces bactéries dans les conditions naturelles (Cavanaugh et al. 1987). Contrairement aux symbiontes sulfoxydants, les méthanotrophes possèdent des lipides caractéristiques dont la quantification et l'analyse isotopique confirment la prédominance de la méthanotrophie dans la nutrition des hôtes (Abrajano et al. 1994; Jahnke et al. 1995; Pond et al. 1998; MacAvoy et al. 2002) et discriminent l'origine thermo- ou biogénique du méthane utilisé. L'apparent couplage entre l'assimilation du carbone et de l'azote chez *B. childressii* suggère un possible rôle des bactéries méthanotrophes dans la fixation de l'azote (Dattagupta et al. 2004).

3.2.4 - La double symbiose

Suspectée dès 1987 chez *B. heckeræ* (Cavanaugh et al. 1987), la double symbiose unissant un hôte à des bactéries chimioautotrophes sulfoxydantes et à des bactéries méthanotrophes a été démontrée chez *B. brooksii* en 1993 par des observations de MET et des tests enzymatiques (Fisher et al. 1993). Après l'étude de ces deux espèces associées aux sources de fluides froids, l'analyse comparative de l'ARNr 16S des bactéries symbiotiques a

montré que la double symbiose concernait aussi *B. puteoserpentis*, une moule des sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique (Distel et al. 1995). Des observations de TEM montrent que *B. boomerang*, la moule identifiée sur le prisme d'accrétion de la Barbade, abrite également une double symbiose (Olu et al. 1996). La dernière espèce en date chez laquelle une telle double symbiose a été démontrée est *B. azoricus*, au moyen de l'analyse lipidique (Pranal et al. 1996) et d'observations en MET (Fiala-Médioni et al. 2002). Ces doubles symbioses permettraient à l'organisme d'accroître sa flexibilité face à la variabilité des ressources de l'environnement (Distel et al. 1995).

Au moment de leur découverte chez les mytilidés, les symbioses unissant un hôte à plusieurs bactéries chimiosynthétiques n'étaient connues que dans des cas de symbioses extracellulaires, comme par exemple chez les oligochètes (Giere 1985) ou les thyasiridés (Southward 1986).

L'utilisation de méthane et de dioxyde de carbone comme sources de carbone, corroborant la co-existence des deux types de bactéries, a été démontrée chez *B. puteoserpentis* et *B. azoricus* (Robinson et al. 1998; Pimenov et al. 2002). La présence de lipides biomarqueurs typiques des méthanotrophes (16:1(n-8)) et d'autres, plus discutables, attribués aux sulfoxydantes (16:1(n-7)) dans les tissus asymbiotiques confirme le rôle nutritionnel des deux types de symbiontes chez *B. azoricus* (Pranal et al. 1996), et a permis d'estimer leur contribution relative autour de 20% pour les sulfoxydantes et 15 à 25% pour les méthanotrophes (Pond et al. 1998).

3.2.5 - Autres associations biologiques, parasitisme

Outre les bactéries symbiotiques, un certain nombre d'espèces de *Bathymodiulus* abritent des polychètes commensaux de grande taille appartenant au genre *Branchipolynoe*. Ces polychètes vivent entre les filaments branchiaux (Fisher et al. 1988; Ward et al. 2004). L'examen des tissus de *B. childressii* en MET a révélé une diversité de structures interprétées comme des procaryotes parasites telles les 'rosettes' ou les inclusions ressemblant à des *Chlamydia/Rickettsia* décrites dans les branchies et le diverticule digestif. Des ciliés et des trématodes ont aussi été décrits. Les intensités d'infections sont variables, parfois jusqu'à dix fois supérieures à celles observées chez la moule côtière *Mytilus edulis*, et associées à une diminution de la fertilité (Powell et al. 1999). L'examen de *B. heckerae* et *B. puteoserpentis* a enrichi cet inventaire de cinq formes d'inclusion distinctes, dont certaines sont associées à des nécroses tissulaires. La moule hydrothermale *B. puteoserpentis* est cependant infectée par seulement deux types de parasites, contre neuf pour l'espèce de fluides froids *B. heckerae*

(Ward et al. 2004). L'influence de ces parasites sur la dynamique des populations de mytilidés symbiotiques demeure inexplorée.

L'exploration de la diversité des bactéries associées aux mytilidés symbiotiques était jusqu'à ces dernières années limitée par l'accessibilité des moyens techniques nécessaires (biologie moléculaire, séquençage, voir Fig. 2.4), si bien que des questions demeurent sur l'identité d'un certain nombre de microorganismes observés dans les tissus, ainsi que sur l'existence plausible d'autres types de symbiotes associés à ces mytilidés (Ward et al. 2004).

3.3 - Reproduction

3.3.1 – Reproduction des mytilidés

A l'instar des bivalves côtiers, l'alternance des sexes semble vraisemblable chez *Bathymodiolus* (Martoja 1995), et l'hermaphroditisme simultané est très rare (Le Pennec and Beninger 2000). La gamétogenèse est discontinue chez *B. azoricus* (Comtet and Desbruyères 1998; Comtet et al. 1999), *B. puteoserpentis* et *B. elongatus* (Le Pennec and Beninger 2000) et probablement induite par des signaux environnementaux périodiques tels les changements de température, la photopériode, ou la variation de flux organique particulière au niveau des sites moyennement profonds. Les oocytes sont de même taille que ceux des *Mytilus edulis* côtiers, et plus petits que ceux des autres bivalves symbiotiques, ce qui suggère une stratégie extrotraphique précoce (Le Pennec and Beninger 2000). Les larves sont planctoniques (Lutz et al. 1980). Elles ont une stratégie alimentaire distincte de celle des adultes, mais ne reposant jamais principalement sur la matière organique dérivée de la photosynthèse (Trask and Van Dover 1999). L'établissement des larves dépend de stimuli physico chimiques environnementaux indiquant un environnement favorable, et le recrutement est, à l'image de la gamétogenèse, discontinu chez la plupart des espèces (Comtet and Desbruyères 1998).

3.3.2 – Transmission des symbiotes d'une génération à la suivante

L'utilisation d'un marqueur génétique très résolutif, l'ITS (Internal Transcribed Spacer), en parallèle avec des marqueurs chez l'hôte a permis de mettre en évidence un déséquilibre de liaison entre allèles de l'hôte et du symbiote sulfoxydant dans une zone hybride entre deux espèces de *Bathymodiolus*, ce qui indiquerait une transmission strictement environnementale de ces symbiotes (Won et al. 2003). L'existence d'irrégularités dans la membrane apicale des bactériocytes, évoquant des figures d'endocytose, avait déjà conduit à proposer cette hypothèse (Dubilier et al. 1998). Cependant, aucune observation directe ne permet de conclure fermement et de généraliser cette hypothèse aux autres espèces. Le mode de transmission des symbiotes méthanotrophes demeure quant à lui inconnu.

3.4 - Evolution

L'origine des mytilidés symbiotiques semble remonter au cénozoïque, avec des fossiles ressemblant aux *Bathymodiolus* datant d'environ 60 millions d'années, mais dont l'interprétation est difficile, puisque les mytilidés n'ont que peu de caractères morphologiques permettant de les identifier, et que rien ne prouve que ceux-ci aient eu de bactéries associées (Little and Vrijenhoek 2003). L'étroite parenté unissant *Bathymodiolus* avec diverses moules de petite taille (*Idas*, *Myrina*, *Tamu*, *Benthomodiolus*) trouvées dans d'autres environnements chimiosynthétiques, carcasses de baleine ou bois coulés, a conduit à proposer de tels environnements comme intermédiaires. Ces environnements susceptibles d'être présents ponctuellement dans tous les océans auraient pu constituer des relais ayant permis, et peut-être précédé, la colonisation des zones de fluides froids et des sources hydrothermales (Distel et al. 2000). L'association éventuelle de certains de ces mytilidés à des bactéries chimiosynthétiques aurait alors constitué une exaptation.

3.4.1 – Evolution dans le genre *Bathymodiolus*

Une étude comparant quelques espèces de *Bathymodiolus* présents en zones hydrothermales et d'autres espèces associées aux sources de fluides froids suggère une origine ancienne du groupe (grandes distances génétiques), avec un ancêtre commun issu des sites de fluides froids, et une origine monophylétique secondaire des mytilidés des sources hydrothermales (Craddock et al. 1995). Un cas de réversion récente d'habitat (retour sur les sites de fluides froids à partir d'un ancêtre hydrothermal) est évoqué pour *B. heckerae* (Won et al. 2002). Le caractère fragmenté et discontinu dans l'espace et dans le temps de l'habitat favorable à l'établissement des mytilidés symbiotiques fournit un bon terrain pour l'étude des flux de gènes et des phénomènes de différenciations entre populations. Cette étude se base sur l'utilisation d'une diversité de marqueurs (enzymes, gènes mitochondriaux ou nucléaires). Les populations de *B. thermophilus* peuplant la ride du Pacifique oriental (EPR) et les sites des Galapagos sont ainsi différenciées (Grassle 1985) entre elles, avec des flux de gènes réduits (Craddock et al. 1995). L'existence d'espèces cryptiques a d'ailleurs été suggérée à propos des individus des sites situés sur la microplaque de Pâques (Won et al. 2003). L'isolement reproducteur des individus de *B. brevior* peuplant les sites de North Fiji par rapport aux populations du bassin de Lau a également été démontré (Moraga et al. 1994). Ces différenciations sont attribuées à l'existence de barrières de dispersion formées par certains courants (Won et al. 2003), mais aussi la profondeur (Maas et al. 1999). Elles pourraient indiquer que des phénomènes de spéciation sont en cours.

3.4.2 – Evolution des bactéries symbiotiques méthanotrophes et sulfoxydantes

Les bactéries associées aux mytilidés sont des gamma protéobactéries. Les sulfoxydantes forment un clade monophylétique incluant également les symbiontes de vésicomidés et du thyasiridé *Maorithyas hadalis* (Distel et al. 1988; Fujiwara et al. 2000). Les méthanotrophes forment un second groupe monophylétique distinct, proche des bactéries libres méthanotrophes de type I (Distel and Cavanaugh 1994; Fujiwara et al. 2000). Ces deux types de symbioses ont donc des origines évolutives distinctes (Distel and Cavanaugh 1994) (Fig. 2.1).

Malgré la monophylie de chacun des deux clades de symbiontes, la co-évolution hôte bactéries n'a jamais été démontrée. Cette 'non démonstration' a souvent été attribuée à la faible résolution phylogénétique de l'ARNr 16S pour les courtes distances évolutives, mais les résultats récents indiquent la transmission probablement environnementale des symbiontes (au moins chez les sulfoxydants, voir 4.4) et fournissent une autre explication potentielle (Won et al. 2003). Les mytilidés phylogénétiquement proches du genre *Bathymodiolus*, comme *Idas*, ont été très peu étudiés, et l'existence de symbioses chez ces bivalves demeure un hypothèse suggérée par leur mode de vie, souvent associé à des débris organiques (carcasses de baleines, bois coulés) (Distel et al. 2000).

3.5 – Ecologie des mytilidés symbiotiques

Présents sur de nombreux sites de fluides chauds ou froids, et encore jamais identifiés en dehors de ces environnements, ou à des profondeurs excédant 3600 mètres, les représentants du genre *Bathymodiolus* sont particulièrement adaptés à leur niche écologique (Sibuet and Olu 1998). En effet malgré leur capacité à filtrer le plancton, notamment sur les sites peu profonds (Page et al. 1991; Pile and Young 1999), la dépendance des mytilidés à l'égard des fluides est quasiment totale. Ainsi, un ralentissement ou un arrêt des émissions occasionne une nette détérioration de leur état physiologique, une perte d'intégrité des tissus symbiotiques, une nette diminution de la densité de bactéries (qui sont digérées), et une diminution du $\delta^{13}\text{C}$ suggérant un recyclage du carbone endogène (Fisher et al. 1988; Kochevar et al. 1992; Raulfs et al. 2004). Ce phénomène est cependant réversible, si des fluides sont émis de nouveau (Kadar et al. 2005).

Cette spécialisation s'avère néanmoins très efficace pour exploiter les niches écologiques liées aux environnements chimiosynthétiques. L'abondance de la ressource apportée par les fluides aux bactéries symbiotiques, la faible compétition (voir I.2.7.2) et la rareté des prédateurs constituent des avantages considérables susceptibles d'expliquer la

dominance des mytilidés du genre *Bathymodiolus* sur de nombreux sites. En effet, les seuls prédateurs connus des *Bathymodiolus* sont le gastéropode *Phymorhynchus* sp. (Wàren and Bouchet 2001) et le poisson chimaeridae *Hydrolagus affinis* (Marques and Porteiro 2000). Les infections parasitaires pourraient toutefois entraîner une importante mortalité (Ward et al. 2004).

3.5.1 – Adaptations à la toxicité des fluides

Outre la symbiose, l'adaptation des mytilidés aux environnements de fluides passe également par leur capacité à tolérer la toxicité des fluides. Si la détoxification des sulfures par les bactéries symbiotiques reste très discutée, la capacité des mytilidés à détoxifier (Larsen et al. 1997) et à accumuler d'importantes quantités de métaux sans en être affecté est avérée (Geret et al. 1998; Rousse et al. 1998). Ces métazoaires, particulièrement dans leurs stades de développement précoces, ont développé des mécanismes efficaces de réparation de leur ADN (Pruski and Dixon 2003), un élément clé de leur résistance aux brusques variations de température. Néanmoins, ils ne résistent pas à un choc thermique excédant 30°C (Van Dover 2000).

3.5.2 – L'environnement chimique et son influence sur la nutrition symbiotique

Les mytilidés sont épibenthiques, et vivent le plus souvent attachés à un substrat dur par le byssus. Quelques espèces comme *B. boomerang* vivent parfois sur le sédiment ou partiellement enfouies (Olu et al. 1996). Les paramètres physico chimiques de l'eau baignant les mytilidés, qui résulte du mélange de l'eau de mer et des fluides, sont peu connus (Desbruyères et al. 2001), et extrêmement variables dans l'espace et le temps (Johnson et al. 1994). Quelques études menées principalement en domaine hydrothermal montrent néanmoins que la concentration *in situ* en sulfures peut varier entre sites (Le Bris et al. 2003) (Fig. 2.6). Des concentrations de sulfure de dihydrogène atteignant 325 µM, mais la plupart du temps bien plus basses (de 1 à 42 µM) ont été mesurées au voisinage immédiat des moules sur les sites des rides du Pacifique oriental (Johnson et al. 1986; Fisher et al. 1988) et médio Atlantique (Sarradin et al. 1999). La variabilité à petite échelle du pH (Le Bris et al. 2001) joue probablement un rôle important puisque celui-ci contrôle les équilibres entre les formes du soufre (H₂S, HS⁻ (Rozañ et al. 2000)) et du carbone (CO₂, HCO₃⁻), qui sont plus ou moins exploitables par les mytilidés et leurs symbiontes. Les ions métalliques sont très abondants, particulièrement en contexte hydrothermal (cuivre, plomb, cadmium) (Sarradin et al. 1999; Desbruyères et al. 2001).

Parallèlement à la caractérisation du microenvironnement physico-chimique des mytilidés, diverses études ont examiné l'influence exercée par l'environnement sur leur

nutrition par leurs symbiotes. L'analyse des signatures isotopiques du carbone et de l'azote de tissus chez des specimens de *B. azoricus* collectés sur deux zones du site Lucky Strike (MAR) a ainsi permis de constater des variations au sein d'un site, suggérant l'existence d'une réponse nutritionnelle (Trask and Van Dover 1999). Une corrélation entre signatures isotopiques du carbone des mytilidés et concentration en sulfure et méthane du fluide a également été établie pour les sites hydrothermaux de la ride médio Atlantique. Ces mytilidés, *B. azoricus* et *B. puteoserpentis* ont des doubles symbioses. La corrélation observée a donc été attribuée à un ajustement de la contribution relative des bactéries sulfoxydantes et méthanotrophes à la nutrition de l'hôte en fonction des concentrations relatives en sulfure et méthane (Colaco et al. 2002), les bactéries méthanotrophes ayant un rôle nutritionnel prépondérant ainsi qu'une abondance relative supérieure par rapport aux sulfoxydantes chez les mytilidés des sources riches en méthane (Fiala-Médioni et al. 2002; Pimenov et al. 2002). Des expériences de transplantation de *B. childressii* entre deux sites de fluides froids, aux caractéristiques très différentes (Brine Pool et Bush Hill dans le Golfe du Mexique), ont permis d'estimer le turn over du carbone et de l'azote, et d'analyser les changements physiologiques. Le turn over de carbone et la croissance des individus transplantés depuis un site pauvre en méthane vers un site riche étaient beaucoup plus rapides que ceux des individus transplantés depuis un site riche vers un site pauvre (Bergquist et al. 2004; Dattagupta et al. 2004).

Dans leur majorité, les études visant à caractériser l'environnement chimique et les études portant sur la variabilité des symbioses ont été menées séparément, si bien que seules des hypothèses ont pu être formulées concernant la nature de l'interaction entre environnement et mytilidés associés à des bactéries. Le développement des outils d'analyse physico-chimique (analyseurs *in situ*, outils de collecte) permet aujourd'hui une analyse plus fine, et à une échelle plus appropriée, de l'environnement des métazoaires. Par ailleurs, le développement d'outils pour l'étude de la physiologie ou l'analyse moléculaire rend possible l'investigation plus précise et plus quantitative des hôtes, des bactéries, et de leurs interactions. L'analyse intégrée des symbioses bactériennes d'invertébrés dans leur contexte écologique ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension du fonctionnement des écosystèmes à base chimiosynthétique.

Site	Espèce	Localisation	[H ₂ S] (μM)	[CH ₄] (μM)	T (°C)	Références
Ride du Pacifique oriental	<i>B. thermophilus</i>	Rose Garden: site central	0 – 325	0 - 3.3	2.1 – 14	Fisher et al. 1988, Lilley et al. 1982, Johnson et al. 1994
		Rose Garden: Site périphérique	0 - 35		2.1 – 8	
	<i>Riftia pachyptila</i> (plume)	Genesis	5 – 17		1.6 – 10	Sarradin et al. 1998
	<i>Alvinella pompejana</i> (sortie du tube)		5 - 300		7 – 91	
	<i>R. pachyptila</i>	13°N	7 – 330		2 – 19	Le Bris et al. 2003
	<i>A. pompejana</i>		72 – 1520		3 – 250	
<i>Paralvinella palmiformis</i>	0 - 240			2 - 44		
Ride Médio Atlantique	<i>B. azoricus</i>	Menez Gwen	0.5 - 18		10 - 26	Sarradin et al. 1999
			0.7		10.1	Desbruyères et al. 2001
		Lucky Strike	0.5 - 42		6 - 13	Sarradin et al. 1999
		Lucky Strike: Eiffel Tower	2.1	0	6.7	Desbruyères et al. 2001
		Lucky Strike: Barrio Alto	1.2	0.1	6.7	
		Lucky Strike : Elisabeth	1.3	0	5.7	
	3.2	0.8	6			
	<i>Rimicaris exoculata</i>	Rainbow	8.5	21.9	13.2	
<i>Mirocaris</i> sp.	7.2		6.5	11.2		

Fig. 2.6 : Concentrations de sulfure d'hydrogène et de méthane et température au voisinage immédiat de divers métazoaires associés à des bactéries chimiosynthétiques sur divers sites hydrothermaux des rides du Pacifique oriental et médio Atlantique.

Chapitre III – Caractérisation qualitative et quantitative des symbioses de mytilidés: objectifs, approches méthodologiques et résultats

1 – Objectifs généraux de l'étude

L'étude de l'environnement chimique des métazoaires symbiotiques, de même que l'étude de la variabilité de leurs symbioses, présentent chacune un intérêt évident. C'est pourtant le couplage entre d'une part la description du micro-environnement chimique, et d'autre part la caractérisation des symbioses et l'examen d'éventuelles réponses nutritionnelles, qui permettrait de réellement comprendre les aspects dynamiques des interactions entre bactéries et hôte et l'influence à court et long terme de l'environnement.

Parmi les organismes de la mégafaune des écosystèmes marins profonds à base chimiosynthétique, seuls les mytilidés du genre *Bathymodiolus* sont connus pour abriter des bactéries sulfoxydantes, des bactéries méthanotrophes ou les deux à la fois dans leurs tissus. Cette caractéristique unique, associée à la large distribution géographique de ce genre dans les écosystèmes à base chimiosynthétique (Von Cosel 2002) en fait un excellent modèle pour l'étude des symbioses entre métazoaires et bactéries chimiotrophes.

Le travail présenté ici a pour objectif l'étude intégrée de la diversité des bactéries chez plusieurs mytilidés supposés abriter une double symbiose, et la mise en évidence des relations existant entre métazoaires, symbiontes et caractéristiques chimiques de l'environnement et des fluides grâce à une approche la plus quantitative possible. La comparaison entre mytilidés peuplant différents types de sites de fluides froids et hydrothermaux, dans lesquels les concentrations en donneurs d'électrons des deux types de bactéries putatives peuvent varier considérablement, devrait nous permettre d'identifier les divers facteurs biologiques ou environnementaux qui influencent la symbiose. De même, cette étude a pour but de fournir des informations nouvelles sur l'évolution et la biogéographie (Fenchel 2003) des bactéries symbiotiques.

2 – Stratégie et techniques

2.1 – Stratégie d'échantillonnage et d'étude

La difficulté à décrire l'environnement à l'aide de mesures *in situ* fiables est liée à la nécessité d'employer un équipement lourd et une instrumentation dédiée et de travailler à des

échelles spatio temporelles pertinentes compte tenu de la taille des organismes et de la variabilité de l'environnement (Desbruyères et al. 2000). Par ailleurs, l'absence de capteurs *in situ* fiables, notamment pour mesurer les concentrations de méthane (voir chapitre 2), impose de remonter des échantillons à la surface pour effectuer ces mesures à bord (Caprais et Le Bris, comm. pers. ; Lilley et al. 1982). En raison de ces difficultés, la réalisation d'études intégrées est encore peu développée. Au cours de ce travail, nous avons néanmoins pu bénéficier de telles approches, particulièrement durant la campagne à la mer menées dans le cadre du programme Biozaire. Des échantillons d'eau et de sédiment ont été collectés en parallèle des échantillons biologiques pour quantifier les sulfures et le méthane au niveau de zones cibles. Les échantillons ont été collectés dans des zones contrastées d'un même site ou sur des sites différents afin de pouvoir comparer les résultats obtenus.

L'étude des symbioses se heurte par ailleurs aux problèmes classiques rencontrés par les microbiologistes s'intéressant à l'environnement, notamment l'incultivabilité de la plupart des bactéries (Amann et al. 1995). La compréhension d'un écosystème microbien passe en effet par la description de la diversité d'organismes impliqués, et de leur importance relative, la mesure de leurs activités et de leur potentiel métabolique, l'élucidation de leurs interactions, et le suivi de la dynamique spatio temporelle de ces communautés (Madigan et al. 2002). L'absence de critères morphologiques fiables pour l'identification des procaryotes, la nature essentiellement chimique de leurs interactions, et l'échelle d'observation nécessitent l'emploi de tout un ensemble de techniques spécifiques et nécessaires pour aborder l'étude de l'écologie microbienne (Azam 2001). Selon les échantillons, ces techniques ont été utilisées pour :

- Caractériser les bactéries et leur potentiel métabolique par le séquençage de leur ARNr 16S et de gènes de fonctions propres aux métabolismes méthanotrophe, sulfoxydant et autotrophe, en vue de confirmer la double symbiose ou de découvrir éventuellement de nouveaux symbiontes
- Mettre en évidence et observer *in situ* par FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) les différents types de symbiontes dans les tissus de l'hôte, en vue d'examiner leur répartition, leur abondance relative ainsi que d'éventuelles associations particulières entre bactéries
- Quantifier les différents types de symbiontes par Dot Blot (hybridation quantitative de l'ARN)
- Evaluer la contribution relative des différents symbiontes à la biomasse de l'hôte par la détermination de la composition isotopique des tissus et de lipides biomarqueurs, ainsi que par le développement d'une méthode utilisant l'ARNr 16S comme biomarqueur.

L'ensemble des résultats doit permettre de mieux comprendre la diversité, l'importance et le rôle des bactéries symbiotiques, ainsi que les relations existant entre les partenaires de l'association et l'environnement.

2.2 – Origine des échantillons et campagnes

Les échantillons sur lesquels les travaux ont été réalisés ont été collectés au cours de plusieurs campagnes organisées par divers partenaires (Ifremer, WHOI, MPI, Penn State University) sur divers sites aux caractéristiques plus ou moins bien connues, et récapitulées dans le tableau (Fig. 3.1 et 3.2). Chacune de ces campagnes a permis la collecte de mytilidés en vue de la caractérisation de leurs symbiontes par séquençage de gènes marqueurs et hybridation de sondes fluorescentes (FISH). L'importance accordée à l'étude des mytilidés était cependant variable suivant les campagnes, et ce sont celles menées sur les sites de fluides froids qui ont permis l'approche la plus intégrative, et notamment la caractérisation chimique de l'environnement (campagnes Biozaire et Nautinil), et la collecte d'échantillons en vue d'analyses isotopiques et d'études sur l'ARN (campagnes Biozaire, Deep Seeps et Nautinil).

2.3 – Techniques mises en oeuvre

Jusqu'à ces dernières années, l'obtention de culture pures, ou au moins d'enrichissements sur milieux sélectifs, était le seul moyen d'étudier les procaryotes. Or l'efficacité d'un milieu de culture repose sur notre capacité à simuler la niche écologique de l'organisme que l'on souhaite isoler (caractéristiques physiques, nature et concentrations des donneurs et accepteurs d'électrons, sources de carbone...). Une telle approche est considérablement limitée par notre méconnaissance des conditions environnementales réelles, de leur diversité et de leur variabilité à l'échelle des microorganismes, ainsi que de l'importance des interactions entre organismes. L'approche culturelle échoue le plus souvent à isoler les différents microorganismes composant la communauté, même les principaux (Overmann and van Gemerden 2000). Le pourcentage d'espèces « cultivables » oscille suivant l'environnement entre 0,001 et 15%, ce qui représente une infime fraction, des espèces d'une communauté (Amann et al. 1995; Monfort and Baleux 1999). Les symbioses bactériennes chimiotrophes offrent un exemple encore plus spectaculaire, puisqu'à ce jour aucun symbionte n'a pu être obtenu en culture pure (Nelson et al. 1995).

Diverses méthodes ne reposant pas sur la mise en culture, permettant l'étude de l'écologie microbienne, ont été développées depuis une trentaine d'année (revues dans (Amann et al. 1995) et (Azam 2001)). Ces techniques, en permettant d'explorer la diversité

Localisation	Nom	Coordonnées	Prof. (m)	Campagne	Type d'environnement	$\delta^{13}\text{C}$ du méthane (origine)	Microorganismes visibles	Faune symbiotique	Faune accompagnatrice	Références
Golfe de Guinée	Régab	5°52.81'S 9°37.94'E	3160	Biozaire 2	Pockmark (diamètre 800m)	-69 ‰ (B)	Tapis de sulfoxydantes	<i>Bathymodiolus</i> n. sp., <i>Lamellibrachia southwardii</i> , Vésicomysidés	<i>Chiridota</i> , gastéropodes	1, 2, 3, Von Cosel (comm. pers.)
Golfe du Mexique	Florida Escarpment	26°02.00'N 84°55.03'W	3300	Deep Seeps	Rebord d'une plateforme carbonatée	-61 à -93.8 ‰ (B+T)		<i>B. heckerae</i> , <i>Escarpia laminata</i> , <i>Calyptogena</i>	<i>Chiridota</i> , <i>Munidopsis</i> , <i>Alvinocaris</i>	4, 5, 6, 7
	Atwater Canyon (AT425)	27°34.1N 88°29.8W	1930		Sommet d'une colline diapirique	-49.3 ‰ (T)	Tapis de sulfoxydantes	<i>B. brooksii</i> , Siboglinidés		8, 9, 10
	Alaminos Canyon	26°21.32'N 94°30.12'W	2220		Canyon (zone de coalescence entre couches de sels)		Tapis de sulfoxydantes	<i>L. bahramii</i> , <i>E. laminata</i> , <i>B. brooksii</i> , <i>B. childressii</i>	Alvinocaridés	6, 10
Ride Méditerranéenne	Zone Centrale	32°38.44N 29°54.98E	2129	Nautinil	Pockmarks			<i>Lamellibrachia</i> sp., <i>Idas</i> sp.	Gastéropodes, galathées, échinodermes	Rapports de mission

Fig. 3.1 : Principales caractéristiques des sites de fluides froids sur lesquels des échantillons ont été prélevés pour le présent travail. Références : 1 Ondréas et al. submitted ; 2 Charlou et al. 2004 ; 3 Andersen et al. 2004; 4 Hecker 1985 ; 5 Cavanaugh et al. 1987 ; 6 Carney 1994 ; 7 Turnispeed et al. 2004 ; 8 Lanoil et al. 2001 ; 9 MacDonald et al. 2003 ; 10 Robinson et al. 2004.

Nom	Coordonnées	Prof. (m)	Campagne	[H ₂ S] (mM)	[CH ₄] (mM)	Mytilidé symbiotique	Références
Menez Gwen	37°51'N, 31°31'W	850	ATOS	1.6	1.7	<i>B. azoricus</i>	1, 2, 3, 4
Lucky Strike	37°17'N, 32°16'W	1650	AT5-2	2.1	0.6	<i>B. azoricus</i>	1, 2, 4
Rainbow	36°13'N, 33°54'W	2350	AT5-2	1.75	2.35	<i>B. azoricus</i>	2, 4
Logatchev	14°45'N, 44°58'W	3037	Hydromar	<1	2.1	<i>B. puteoseprentis</i>	2, 3, 4

Fig.3.2 : Principales caractéristiques des sites hydrothermaux de la ride Médio Atlantique sur lesquels des échantillons ont été prélevés pour le présent travail. Références : 1 Charlou et al. 2000 ; 2 Desbruyères et al. 2000 ; 3 Gebruk et al. 2000 ; 4 Colaco et al. 2002.

spécifique et fonctionnelle, et de quantifier des activités et des populations de microorganismes ont totalement renouvelé la microbiologie. La présente étude a fait appel à un certain nombre d'entre elles, décrites ci-après.

2.3.1 – Caractérisation de la diversité par séquençage de l'ARN ribosomique 16S

Le développement récent de l'écologie microbienne doit beaucoup aux méthodes basées sur le séquençage des molécules d'ADN et d'ARN. Ainsi, la description qualitative de la diversité de microorganismes présents en symbiose repose sur l'amplification de l'ARN ribosomique 16S, le clonage et le séquençage des produits, et sur l'analyse comparative des séquences au moyen de méthodes de reconstruction phylogénétique visant à les assigner à des groupes taxonomiques (Voir encadré page 75).

Cet ARN est un bon marqueur génétique pour étudier l'évolution des procaryotes pour plusieurs raisons : tout d'abord, tous les procaryotes possèdent cet ARN, puisqu'il fait partie intégrante de la petite sous unité du ribosome et participe, avec une série de protéines, à son activité de traduction (Gutell et al. 2002). De plus, les séquences sont suffisamment longues (environ 1500 bases) pour dresser des phylogénies robustes. Enfin, l'évolution de l'ARNr 16S est relativement contrainte par son rôle et sa structure secondaire (Fig. 3.3), et donc assez lente, ce qui permet de l'utiliser pour établir des relations entre procaryotes éloignés phylogénétiquement, et limite le nombre de mutations ramenant une position à son état initial (exemple : C->G->C) altérant la fiabilité du signal phylogénétique (Woese 1987; Amann et al. 1995). L'existence de régions plus ou moins conservées permet aussi de comparer des organismes plus proches. Cette molécule est désormais considérée comme le marqueur standard pour l'étude de la diversité des procaryotes, et plus de 100000 séquences sont disponibles dans les banques de données comme RDP (Ribosomal Database Project (Cole et al. 2003)). Outre l'ARNr 16S, certains gènes associés à des métabolismes particuliers ont été

séquencés à partir de certains échantillons en vue de confirmer le potentiel métabolique des symbiontes. La méthanotrophie a été recherchée par le séquençage de *pma*, gène codant la sous unité A de la méthane mono oxygénase (voir I.2.7.1.1.1) (Bourne et al. 2000; Elsaied et al. 2005). L'autotrophie a été recherchée par le séquençage de la Rubisco (Elsaied and Naganuma 2001), et enfin la capacité à oxyder les sulfures a été recherchée par le séquençage du gène *APS* codant pour l'APS réductase (voir I.2.7.1.2) (Deplancke et al. 2000).

En raison des divers biais inhérents à l'étape d'amplification, cette description de la diversité n'est cependant pas quantitative. En effet, la PCR est une réaction exponentielle, et les divers artefacts (efficacité différente selon les séquences, affinité des amorces, apparition de séquences composites de plusieurs organismes...), de même que la taille limitée des banques de clones examinées introduisent des biais qui font que les effectifs obtenus pour les différentes séquences ne reflètent pas les effectifs dans l'échantillon de départ, et que la diversité est sous estimée (Qiu et al. 2001). Il est donc nécessaire de compléter cette description par une étape de quantification des bactéries identifiées.

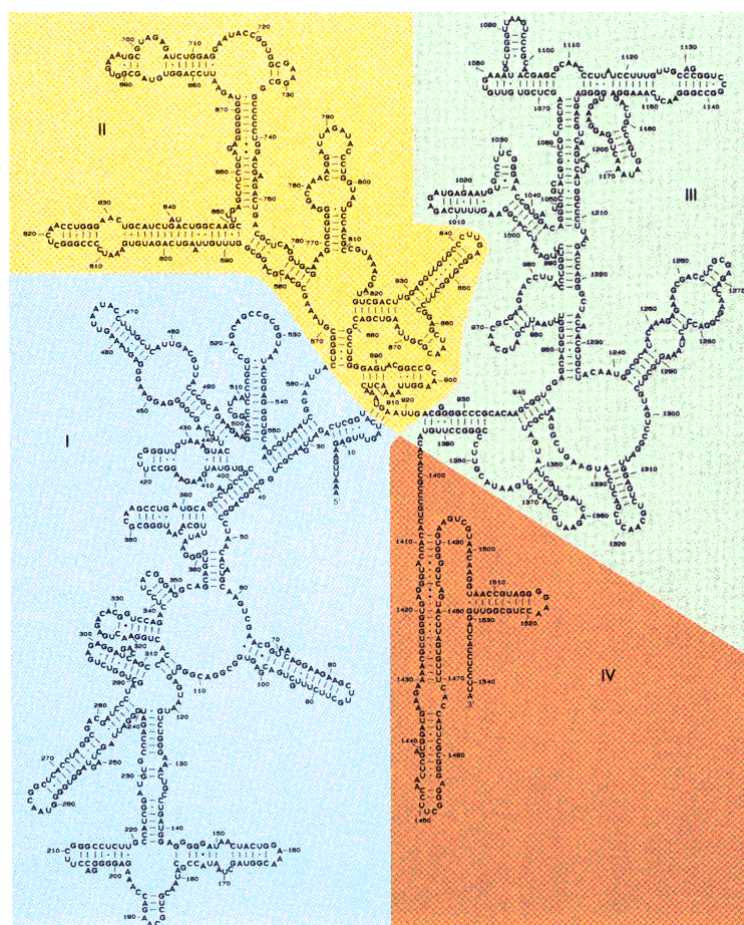


Fig. 3.3 : Structure secondaire de l'ARNr 16S d'*Escherichia coli*. Les nombres sur la séquences correspondent à la numérotation des nucléotides. Figure tirée de <http://www.aw-bc.com/mathews/ch27/fi27p15.gif>

2.3.2 – Techniques d'hybridation

La quantification des différents phylotypes fait intervenir diverses méthodes d'hybridation. Les séquences obtenues au cours du séquençage de l'ARN ribosomique 16S sont alors utilisées pour mettre au point des sondes oligonucléotidiques plus ou moins spécifiques, marquées par un fluorochrome, une protéine ou un composé marqué par radioactivité. L'existence de régions plus ou moins conservées dans l'ARNr 16S permet la réalisation de sondes à tous les niveaux phylogénétiques, depuis l'embranchement jusqu'à la lignée bactérienne. Les sondes sont ensuite hybridées en conditions stringentes.

Deux techniques d'hybridation ont été utilisées au cours de cette étude. D'une part, l'hybridation directe sur des sections transversales de branchies ou de gonades (Fluorescence *In Situ* Hybridization ou FISH) (Amann et al. 1995). Dans ce cas les sondes marquées par un fluorochrome s'hybrident à l'ARNr 16S contenu dans chacun des nombreux ribosomes présents dans les cellules actives, aboutissant à un signal identifiable sous un microscope à épifluorescence, et permettent de dénombrer les cellules et d'observer leur morphologie, leur localisation, ou les relations spatiales entre différentes bactéries (Fig. 3.4). La seconde technique est l'hybridation sur membrane (Dot Blot) (Stahl et al. 1988). L'ARN extrait de l'échantillon est déposé sur une membrane de nitrocellulose, en parallèle avec un ARNr de référence de concentration connue. Cette membrane est ensuite hybridée à une sonde marquée radioactivement, puis placée sur un film photographique. L'intensité des points est proportionnelle à la concentration en ARNr cible. L'application de sondes multiples correspondant à tous les types de symbiontes permet alors de quantifier l'abondance relative de l'ARNr 16S de chaque type de bactérie, et donc l'importance de chaque symbionte. En effet, si la quantité d'ARNr 16S n'est pas constante d'une bactérie à une autre, ce qui interdit d'extrapoler des effectifs, elle est néanmoins une fonction du nombre et de l'activité de celles ci (Amann et al. 1995), et donc un indicateur probable de leur contribution à la symbiose.

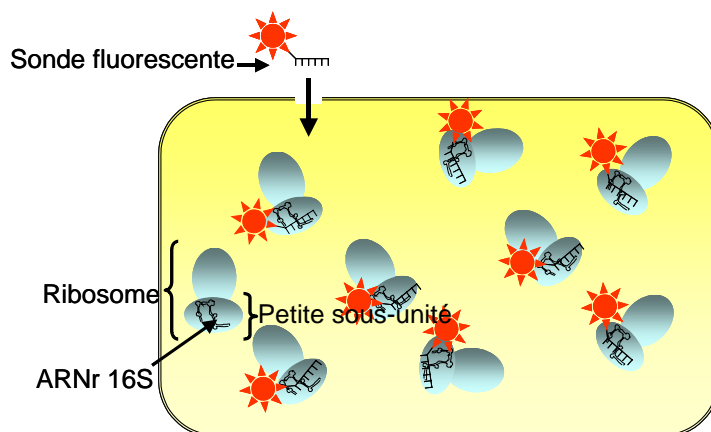


Fig. 3.4 : Mécanisme de l'hybridation *in situ* avec une sonde oligonucléotidique marquée par un fluorochrome. La sonde pénètre dans la cellule perméabilisée, puis s'hybride à la séquence complémentaire de l'ARNr 16S au niveau de chacun des nombreux ribosomes présents. La cellule devient dès lors détectable sous un microscope à épifluorescence.

2.3.3 – Analyses isotopiques sur tissus et biomarqueurs

L'analyse de la composition en isotopes stables des molécules 'naturelles' (biomarqueurs de type lipides, acides nucléiques, protéines...) permet d'identifier la source de certains atomes (C, N, S...) grâce à la connaissance des taux de fractionnement entre isotope lourd et léger lors des réactions enzymatiques, et de suivre leur parcours dans les différents compartiments des écosystèmes (Fig. 3.5 et 3.6) (Hayes 1993; Sassen et al. 1999; Hayes 2001). De telles analyses ont été effectuées à partir des tissus symbiotiques et non symbiotiques des mytilidés, ainsi qu'à partir de fractions lipidiques extraites contenant des lipides déjà identifiés comme caractéristiques des bactéries symbiotiques méthanotrophes, qui ont également été quantifiés (Abrajano et al. 1994; Jahnke et al. 1995; Pond et al. 1998; MacAvoy et al. 2002). Au cours de ce travail, une méthodologie visant à utiliser l'ARN ribosomique 16S comme biomarqueur a également été développée à la suite de travaux initiés sur des cultures pures (MacGregor et al. 2002).

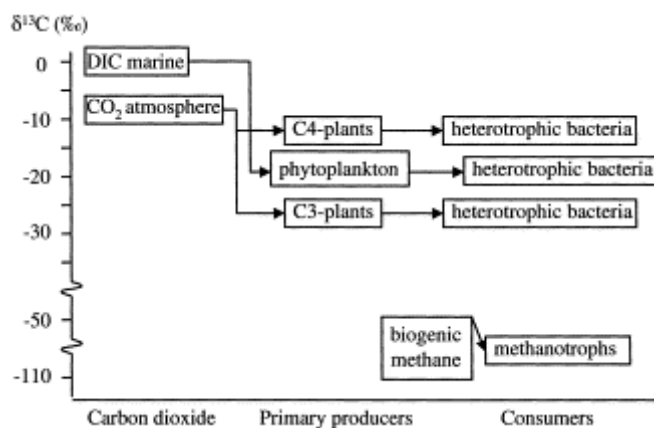
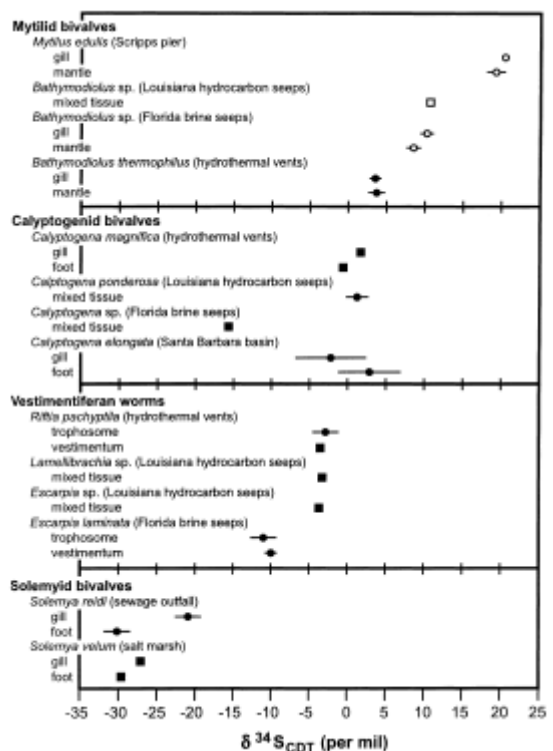


Fig. 3.6 : Comparaison entre signatures isotopiques du soufre ^{34}S chez différents invertébrés abritant des bactéries sulfoxydantes (signes pleins) ou méthanotrophes (signes creux). Figure tirée de Vetter and Fry 1998.

Fig. 3.5 : Relations entre les rapports isotopiques de ^{13}C dans les sources de carbone, les producteurs primaires et les consommateurs. Les organismes hétérotrophes opèrent un faible fractionnement par rapport à la source de nourriture, selon le principe 'on est ce qu'on mange'. Figure tirée de Boschker and Middelburg 2000.



Le concept d'espèce et la phylogénie des procaryotes

Le développement des techniques moléculaires en microbiologie, et notamment de l'analyse comparative des séquences d'acides nucléiques, a conduit les chercheurs à réinterpréter les notions d'espèce chez les procaryotes. En effet, le concept d'espèce tel que pratiqué chez les métazoaires, qui repose entre autres sur l'interfécondité, est inapplicable au monde microbien, lequel est basé sur la reproduction clonale. On parle néanmoins d'espèces bactériennes dans les classifications présentées dans les ouvrages de référence comme le *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Garrity and Boone 2001-2005) et *The prokaryotes*. Le concept repose alors sur des définitions qui ont considérablement changé avec le temps. A une classification basée sur le partage de critères morphologiques, physiologiques ou écologiques jugés pertinents et supposés refléter un histoire évolutive commune, a succédé dans les années 1950 une approche de reconstruction cladistique utilisant une matrice espèces \times caractères, avec un codage de ces derniers aboutissant à la reconstruction de cladogrammes censés refléter la phylogénie 'vraie' (travaux de Sneath).

L'utilisation du matériel génétique pour l'examen des relations de parenté s'est développée d'abord par l'analyse comparative des taux de GC dans les génomes (travaux de Chargaff dans les années 1950), puis au moyen de l'hybridation ADN/ADN (Friedman and de Ley 1965), dont la résolution très limitée nous placerait dans la même espèce que le chimpanzé ou certains lémuriens si elle était appliquée aux mammifères. Le séquençage direct de gènes marqueurs tels l'ARNr 16S et l'analyse comparative des séquences obtenues grâce à diverses méthodes de reconstruction phylogénétique basées sur différents algorithmes (revues dans (Felsenstein 2004)) a conduit à une profonde redéfinition du concept d'espèce chez les procaryotes, et a totalement changé notre vision de l'évolution chez les bactéries (Woese 1987). La découverte par Carl Woese des archées, un groupe de procaryotes anciennement inclus dans les bactéries qui en est en fait aussi distinct que les bactéries le sont des eucaryotes, en est l'illustration la plus spectaculaire (Woese and Fox 1977; Woese et al. 1990). Le concept d'espèce utilisé depuis repose sur un critère, certes arbitraire, mais opérationnel, de similarité entre séquences de l'ARNr 16S (fixé par exemple à 97, 98 ou 99%) (Ward 1998), ce qui limite les problèmes liés à l'interprétation des petites différences habituellement relevées entre séquences proches (Acinas et al. 2004). D'autres propositions existent à l'image de celle définissant l'espèce comme « un regroupement monophylétique et génomiquement cohérent d'organismes présentant un niveau de similitude globalement élevé pour de nombreuses caractéristiques, et détectable par une propriété phénotypique discriminante » (Rosello Mora and Amann 2001).

La découverte des transferts horizontaux de fragments de chromosomes ou d'éléments génétiques extra-chromosomiques (plasmides, virus...) d'une bactérie à une autre même très différente obscurcit encore la notion d'espèce en tant qu'entité génétique propre. Ces transferts peuvent porter sur des opérons entiers (un opéron est un ensemble de gènes consécutifs impliqués dans une même fonction), et redistribuent des voies métaboliques entières à travers l'arbre des procaryotes, si bien que le métabolisme ne coïncide que rarement avec la phylogénie. Leur importance adaptative est considérable (Reaney 1976). L'importance relative de la transmission verticale et des phénomènes de transferts horizontaux dans l'évolution des procaryotes est très discutée, certains plaidant pour une faible importance des transferts (Lerat et al. 2005) tandis que d'autres développent l'idée d'un monde bactérien se comportant comme un gigantesque réseau génétique dans lequel l'évolution par descendance n'a aucune signification (Doolittle 1999).

Aucune définition stricte de l'espèce bactérienne n'est universellement acceptée, et seuls des concepts sont disponibles (Stackenbrandt et al. 2002). La difficulté de cette notion, notamment lorsque seules les séquences d'acides nucléiques sont disponibles comme c'est le cas dans les études de diversité, est à l'origine du vocable prudent de 'phylotype' utilisé pour décrire les séquences identifiées, sans que cela préjuge ou non de leur appartenance à une nouvelle 'espèce'.

3 - Résultats

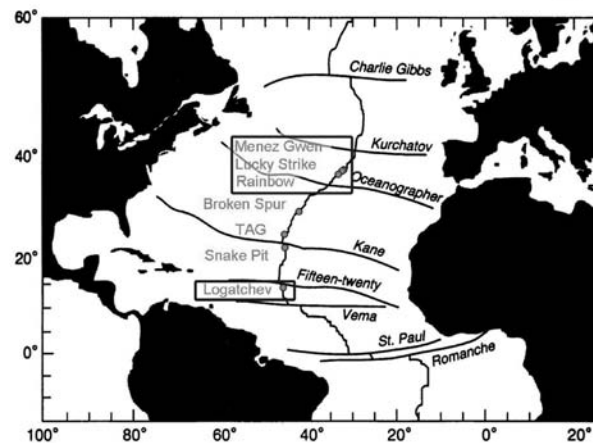
3.1 - Les deux espèces de *Bathymodiolus* peuplant les sites hydrothermaux de la ride Médio Atlantique abritent-ils les mêmes bactéries symbiotiques, et leur abondance relative est-elle influencée par la chimie des fluides ?

Article 'A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge'

Duperron S., C. Bergin, F. Zielinski, Z. P. McKiness, E. DeChaine, C. M. Cavanaugh, N. Dubilier

Soumis à *Environmental Microbiology*

Les sites hydrothermaux situés dans la partie nord de la ride Médio Atlantique abritent deux mytilidés distincts, *Bathymodiolus azoricus* sur les sites les plus au nord : Menez Gwen (850 m), Lucky Strike (1650 m), Rainbow (2350 m), et *B. puteoserpentis* sur les sites situés plus au sud : Snake Pit (3500 m), Logatchev (3040 m). Une zone de latitude intermédiaire, Broken Spur (3050 m), voit les deux espèces cohabiter (voir carte ci-dessus). Chacune de ces espèces abrite une double symbiose avec des bactéries sulfoxydantes et des bactéries méthanotrophes. Les objectifs de cette étude étaient d'une part de comparer les bactéries associées à ces deux mytilidés afin de savoir si ces espèces géographiquement proches sont associées aux mêmes bactéries symbiotiques, et d'autre part de comparer les abondances relatives et la distribution des bactéries symbiotiques dans les branchies des mytilidés collectés sur des sites dont les fluides sont plus ou moins riches en méthane et sulfure d'hydrogène. Les symbiontes ont été caractérisés par le séquençage de leur ARNr 16S, et leur distribution ainsi que leur abondance relative ont été examinées par hybridation de sondes spécifiques (FISH).



Broken Spur (3050 m), voit les deux espèces cohabiter (voir carte ci-dessus). Chacune de ces espèces abrite une double symbiose avec des bactéries sulfoxydantes et des bactéries méthanotrophes. Les objectifs de cette étude étaient d'une part de comparer les bactéries associées à ces deux mytilidés afin de savoir si ces espèces géographiquement proches sont associées aux mêmes bactéries symbiotiques, et d'autre part de comparer les abondances relatives et la distribution des bactéries symbiotiques dans les branchies des mytilidés collectés sur des sites dont les fluides sont plus ou moins riches en méthane et sulfure d'hydrogène. Les symbiontes ont été caractérisés par le séquençage de leur ARNr 16S, et leur distribution ainsi que leur abondance relative ont été examinées par hybridation de sondes spécifiques (FISH).

L'étude a permis d'établir que les symbiontes, tant méthanotrophes que sulfoxydants, des deux espèces de mytilidés ont des séquences d'ARNr 16S identiques sur tous les sites

considérés, ce qui constitue le premier exemple d'une double symbiose impliquant les mêmes bactéries chez deux espèces distinctes de mytilidés. L'hybridation de sondes spécifiques par FISH a confirmé le statut symbiotique des bactéries.

Chacune des espèces de mytilidé se trouve à la fois sur des sites riches et des sites pauvres en méthane. L'examen des différences d'abondances bactériennes entre sites riches et pauvres pour un hôte donné et entre espèces hôtes par FISH, afin de comparer l'effet 'espèce' et l'effet 'chimie des fluides', et d'en connaître l'influence, a permis de montrer que ces abondances dépendent des caractéristiques de l'environnement et non de l'espèce hôte. En effet, l'abondance relative des méthanotrophes par rapport aux sulfoxydants est supérieure, quel que soit l'hôte, sur les sites plus riches en méthane, ce qui appuie l'hypothèse d'une réponse nutritionnelle liée à la concentration des sulfures et du méthane dans le fluide, suggérée par des études antérieures (Trask and Van Dover 1999; Colaco et al. 2002; Fiala-Médioni et al. 2002).

1 **A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *B.***
2 ***puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern**
3 **Mid-Atlantic Ridge.**

4

5 Sébastien Duperron^{1,3}

6 Claudia Bergin¹

7 Frank Zielinski¹

8 Zoe P. McKiness^{2,4}

9 Eric DeChaine²

10 Colleen M. Cavanaugh²

11 Nicole Dubilier^{1*}

12

13 **Keywords:** endosymbiosis, 16S rRNA, sulfur oxidizer, methane oxidizer,
14 fluorescence in situ hybridization (FISH). phylogeny, bacteria

15 **Running head:** Endosymbionts of MAR mussels

16

17 ¹Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen,
18 Germany

19 ²Harvard University, Department of Organismic and Evolutionary Biology,
20 Cambridge, MA 02138, USA

21 ³IFREMER Département Environnement Profond, Centre de Brest, B.P. 70, 29263
22 Plouzané, France

23 ⁴Current address: USDA, National Animal Disease Center, Ames, IA 50010, USA

24 *Corresponding author. Tel: +49 (0)4212028932; Fax: +49 (0)4212028580; E-Mail:

25 ndubilie@mpi-bremen.de

26

26 **Abstract**

27

28 *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* are symbiont-bearing mussels that
29 dominate hydrothermal vent sites along the northern Mid-Atlantic Ridge (MAR).
30 Both species live in symbiosis with two physiologically and phylogenetically distinct
31 Gamma Proteobacteria: a sulfur-oxidizing chemoautotroph and a methane-oxidizer. A
32 detailed analysis of mussels collected from 4 MAR vent sites (Menez Gwen, Lucky
33 Strike, Rainbow, and Logatchev) using comparative 16S rRNA sequence analysis and
34 fluorescence in situ hybridization (FISH) showed that the two mussel species share
35 highly similar to identical symbiont phylotypes. FISH observations of symbiont
36 distribution and relative abundances showed no obvious differences between the 2
37 host species. In contrast, distinct differences in relative symbiont abundances were
38 observed between mussels from different sites, indicating that vent chemistry may
39 influence the relative abundance of thiotrophs and methantrophs in these dual
40 symbioses.

41

41 **Introduction**

42

43 Mussels of the subfamily Bathymodiolinae (family Mytilidae) inhabit
44 hydrothermal vents and cold seeps around the world (von Cosel, 2002). Their
45 adaptive success in such challenging environments that are largely devoid of
46 photosynthetic primary production and subject to rapid changes in geochemical
47 regimes is due to their symbiotic association with chemosynthetic bacteria within
48 their gills (Fisher, 1990; Cavanaugh et al., 2005). Two phylogenetically and
49 physiologically distinct types of Gamma Proteobacteria occur as symbionts in
50 bathymodioline mussels: small chemoautotrophic bacteria shown to oxidize sulfide in
51 at least one species (Nelson et al., 1995), and methanotrophic bacteria with typical
52 stacked internal membranes that use methane both as an electron and a carbon source
53 (Cavanaugh et al., 1987; Fisher, 1993; Distel and Cavanaugh, 1994). Some
54 bathymodioline mussels harbor only a thiotrophic or a methanotrophic symbiont,
55 while others live in a dual symbiosis, with both types of bacteria co-occurring in the
56 gill bacteriocytes (Dechaine and Cavanaugh, 2005). These symbioses enable their
57 hosts to colonize sulfide and/or methane rich environments, in which the primary
58 production of the symbionts ensures the nutrition of the host (Fisher et al., 1987;
59 Fisher and Childress, 1992; Distel and Cavanaugh, 1994; DeChaine and Cavanaugh,
60 2005).

61 Two species of bathymodioline mussels occur along the northern Mid-Atlantic
62 Ridge (MAR) which are morphologically and genetically well differentiated
63 (Craddock et al., 1995; Maas et al., 1999). *Bathymodiolus azoricus* occurs at the
64 northernmost sites (Menez Gwen, Lucky Strike, Rainbow), while *B. puteoserpentis* is
65 found at the 2 vent sites closest to the equator (Snake Pit and Logatchev), with a

66 hybrid zone where both species co-occur at Broken Spur (O'Mullan et al., 2001) (Fig.
67 1). These two mussel species harbor both thiotrophic and methanotrophic symbionts,
68 based on transmission electron microscopy (TEM), and enzymatic and physiological
69 assays (Cavanaugh et al., 1992; Fiala-Médioni et al, 2002). Studies using 16S rRNA
70 sequence analysis and fluorescence in situ hybridization (FISH) confirmed the
71 simultaneous presence of thiotrophic and methanotrophic phylotypes in gill cells of *B.*
72 *puteoserpentis* from the Snake Pit site (Distel et al., 1995). The relative abundance of
73 thiotrophs and methanotrophs, and stable carbon isotope signatures of symbiotic gill
74 tissue can vary both between mussels from a single site, as well as between mussels
75 from different vent sites, indicating that the symbiosis may respond flexibly to
76 differences in vent chemistry (Trask and Van Dover, 1999; Colaco et al, 2002; Fiala-
77 Médioni et al., 2002).

78 In the present study, our aim was to determine whether *Bathymodiolus*
79 *azoricus* and *B. puteoserpentis* share the same symbiotic 16S rRNA phylotypes. This
80 was first shown by Won et al. (2003) for the thiotrophic symbiont in these 2 mussel
81 species, but not investigated for the methanotrophic symbiont and not confirmed for
82 either symbiont type with FISH. For this study, symbionts were examined in mussels
83 collected from 4 vents along the northern MAR, *B. azoricus* from Menez Gwen,
84 Lucky Strike, and Rainbow, and *B. puteoserpentis* from Logatchev. The 16S rRNA
85 sequences from the mussel symbionts were compared to published symbiont
86 sequences from *B. azoricus* collected at Rainbow (Won et al., 2003) and *B.*
87 *puteoserpentis* from Snake Pit (Distel et al., 1995; Won et al., 2003). FISH was used
88 to confirm that the obtained sequences originated from symbionts in the gills and to
89 examine if there are differences in symbiont distribution and relative abundance
90 between the 2 mussel species and between mussels from different vent sites.

91

91 **Material and methods**

92

93 ***Organisms and sampling sites***

94 *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* were collected from 4
95 hydrothermal vent sites located on the northern Mid-Atlantic Ridge (Fig. 1). *B.*
96 *azoricus* specimens were collected from 3 sites: Menez Gwen (37°51'N, 31°31'W,
97 depth 850 m) using the ROV Victor during the ATOS cruise (Ifremer, 2001), and
98 Lucky Strike (37°17'N, 32°16'W, 1650 m depth) and Rainbow (36°13'N, 33°54'W,
99 2350 m depth) using the DSV Alvin during the AT5-2 cruise (WHOI, 2001). *B.*
100 *puteoserpentis* specimens were collected from the Logatchev site (14°45.19'N,
101 44°58.74'W, 3037 m depth) using the ROV Quest during the Meteor cruise Hydromar
102 I, in February 2004.

103 Upon recovery, specimens were kept in insulated containers and chilled (4°C)
104 seawater until dissection. Symbiont-containing gill tissues from 2-4 individuals per
105 site were dissected, with one part frozen immediately in liquid nitrogen and stored at
106 -20°C or -80°C for DNA extraction and another part fixed for fluorescence *in situ*
107 hybridization (FISH) (see below).

108

109 ***DNA extraction and PCR amplification***

110 Total DNA was extracted and nearly full 16S rRNA gene sequences were
111 amplified from frozen gill tissues of 3 individuals from Menez Gwen, 2 individuals
112 each from Rainbow and Lucky Strike, and 4 individuals from Logatchev, using
113 bacterial universal primers 8F and 1492R (Muyzer et al., 1995) and the same protocol
114 and cycling conditions as previously described (Duperron et al., 2005). Four separate

115 PCR reactions were run with 25 or 35 cycles each, and then pooled together prior to
116 cloning.

117

118 *Cloning and sequencing*

119 For each specimen, the pooled PCR products were cloned and inserts of 15 to
120 100 positive clones were partially sequenced using primers 8F or 519F, yielding
121 sequences of ~500 bp. Partial sequences were aligned and compared with BioEdit
122 (Hall, 1997-2001), and potential chimeras, detected by visual inspection of the
123 alignments and using ChimeraCheck (Cole et al., 2003), were eliminated from further
124 analyses. Representative clones were selected and their inserts fully sequenced in both
125 directions (2 to 5 full sequences per individual and symbiont type). Methanotroph-
126 related sequences are registered at EMBL under accession numbers AM083950 to
127 AM083967, thiotroph-related sequences under accession numbers AM083968 to
128 AM083986.

129

130 *Sequence analysis*

131 Full sequences were aligned with a database containing over 30,000 sequences
132 using ARB (Ludwig et al., 2004). Sequences from this study were aligned with
133 symbiont sequences from the databases for MAR mussels and critically evaluated for
134 nucleotide substitutions by assessment of position (*e.g.* stems vs. loops) and
135 complementary base pairing in stems (EMBL accession numbers: Align_000930
136 (methanotrophs) and Align_000931 (thiotrophs)). Related sequences were compared
137 to determine whether differences were unique or shared. Phylogenetic trees were
138 calculated with maximum likelihood using Treefinder (Jobb, 2005), with an optimized

139 General Time Reversible model. Bootstrap values were obtained from 200 replicates
140 using similar parameters.

141

142 *Probe design*

143 Specific oligonucleotide probes were designed for the two dominant 16S
144 rRNA phylotypes obtained from *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* using
145 the PROBE_DESIGN tool of ARB, and their specificity tested against the ARB and
146 Genbank databases. Both had at least 1 mismatch to all other sequences. Stringency
147 and specificity of the Cy3- and Cy5-labeled probes (ThermoHybaid, Germany) was
148 determined with the relevant reference symbiont or strain using a range of formamide
149 concentrations (5 to 60%). References for the thiotroph probe BMARt-193
150 (CGAAGGTCCTCCACTTTA) and methanotroph probe BMARm-845
151 (GCTCCGCCACTAAGCCTA) were a *Bathymodiolus* sp. symbiont from Gabon
152 margin (2 mismatches; Duperron et al., 2005) and *Xenorhabdus bovienii* (1 mismatch;
153 DSMZ strain 4766), respectively. Both probes hybridized specifically with their target
154 at 30% formamide. Eub 338 (Amann et al., 1990) and Non 338 (nonsense of Eub 338)
155 (Wallner et al., 1993) were used as positive and negative controls. Four specific
156 probes targeting the rare methanotroph-related phylotype found in a Menez Gwen *B.*
157 *azoricus* specimen were designed: BazM2-845 (CAGGTTTAGTGGTGGAGC),
158 BazM2-151 (ACGTGGTGAAAACCACGC), BazM2-233
159 (CTGCGTTAGATTAGCTGG) and BazM2-160 (AAACCACGCTAATACCGC). As
160 this rare phylotype was not found using these probes (see Results) their specificity
161 was not further tested.

162

163 *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*

164 Gill tissues of 2 individuals each from Rainbow and Lucky Strike, and of 4
165 individuals from Logatchev were fixed and prepared for FISH as described previously
166 (Duperron et al., 2005). Sections were hybridized using 100 ng of a given probe in 30
167 µl hybridization buffer (0.9 M NaCl, 0.02 M Tris/HCl pH 8.0, 0.01% SDS, 30%
168 formamide) for 3 h at 46°C in pre-heated chambers saturated with hybridization
169 buffer. After hybridization, sections were washed for 15 min at 48°C with buffer (0.1
170 M NaCl, 0.02 M Tris/HCl pH 8.0, 0.01 % SDS, 5 mM EDTA), air dried, and mounted
171 in a non-fluorescent medium (Vectashield, Vector). Sections were examined using a
172 confocal laser-scanning microscope (Zeiss Axioplan 2, Germany).

173

173 **Results and discussion**

174

175 *Symbiont diversity and phylogeny*

176 The bacterial symbionts of *Bathymodiolus azoricus* from 3 MAR vent sites
177 (Menez Gwen, Lucky Strike, and Rainbow) and *B. puteoserpentis* from a more
178 southern site (Logatchev) were characterized and their 16S rRNA sequences
179 compared to published symbiont sequences of the same 2 host species from Rainbow
180 and Snake Pit (Distel et al., 1995; Won et al., 2003) (Fig. 1). In both host species and
181 at all 4 vent sites, all individuals contained 2 dominant phylotype groups in their 16S
182 rRNA clone libraries. Within each phylotype group, sequences were highly similar
183 with at least 99.7% sequence identity, while the difference between the 2 phylotypes
184 groups was at least 11%. Blast searches indicated one phylotype was more than 99%
185 identical to the thiotrophic symbiont sequence of *B. puteoserpentis* from Snake Pit
186 (Distel et al., 1995; Won et al., 2003) and *B. azoricus* from Rainbow (Won et al.,
187 2003), and the other to the methanotrophic symbiont of *B. puteoserpentis* from Snake
188 Pit (Distel et al., 1995). A third phylotype (AM083967) related to methanotrophic
189 *Bathymodiolus* symbionts, but differing from the dominant methanotroph phylotype
190 by 3%, was found in only 2 clones (out of 50) from a single Menez Gwen *B. azoricus*
191 individual.

192 Identity matrices, critical visual examination of the full alignment of the
193 dominant MAR mussel symbiont sequences, and comparison to all bathymodioline
194 symbiont sequences in the database, showed that out of ~1500 nucleotide positions,
195 there were 0 - 3 nucleotide substitutions in each thiotrophic symbiont sequence. The
196 majority of the nucleotide substitutions in the thiotrophic sequences were unique and
197 not found in other sequences or individuals. Only 3 nucleotide substitutions in a single

198 thiotrophic sequence from a Rainbow mussel (AM083974) were shared with a
199 phylotype identified as rare in Rainbow mussels by Won et al. (2003) (Table 1). In the
200 methanotrophic sequences, there were 0 - 7 nucleotide substitutions in each symbiont
201 sequence, of which the majority were unique. Shared substitutions only occurred at 2
202 nucleotide positions, with a dominant Logatchev phylotype showing 1 substitution to
203 mussels from all other sites and a less common Logatchev phylotype showing 2
204 substitutions to all other methanotrophic symbiont sequences (Table 1). These
205 substitutions are not typical for *B. puteoserpentis* symbionts, because at Snake Pit, the
206 symbionts of this mussel species are identical to the dominant phylotype (Distel et al.
207 1995)

208 Most of the unique nucleotide substitutions occurred in highly conserved
209 regions of the 16S rRNA gene or resulted in miss-pairings of stem regions, indicating
210 that these were caused by PCR or sequencing error. In contrast, the shared nucleotide
211 substitutions shown in Table 1 are assumed to be real because they were observed in
212 more than one individual. However, these 2-3 nucleotide differences were not host
213 specific, that is only in *B. azoricus* or *B. puteoserpentis* symbionts, and for the
214 thiotrophs also not site specific. They can therefore not be used for biogeography
215 analyses or to discern relationships between the symbionts of these 2 mussel species.
216 Finally and most importantly, such a minimal degree of sequence divergence, namely
217 only 0.1 - 0.2% is not phylogenetically informative and would not allow the
218 reconstruction of a robust tree. We thus conclude that *Bathymodiolus azoricus* and *B.*
219 *puteoserpentis* individuals collected from vent sites along the MAR share highly
220 similar to identical 16S rRNA phylotypes of the two dominant thiotroph- and
221 methanotroph-related symbionts.

222 One representative sequence, with no unique nucleotide substitutions, was
223 chosen for each of the two symbiont phylotypes and used for phylogenetic
224 reconstruction (Fig. 2). The thiotrophic phylotype, together with the sequences
225 previously published from *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* (Distel et al., 1995; Won
226 et al., 2003), falls within the larger group of mussel thiotrophic symbionts, and is
227 related to a group of thiotrophic symbionts from hydrothermal vent mussels including
228 *B. thermophilus* (bootstrap value 76). The methanotrophic *B. azoricus* / *B.*
229 *puteoserpentis* phylotype belongs to the monophyletic group of methanotrophic
230 symbionts from other *Bathymodiolus* species, but its phylogenetic relationship to
231 these symbionts is unresolved (bootstrap values below 60). The rare methanotrophic
232 sequence from a single *B. azoricus* individual from Menez Gwen clearly falls within
233 the monophyletic clade of *Bathymodiolus* methanotrophic symbionts (bootstrap value
234 100), but is only distantly related to the dominant *B. azoricus* / *B. puteoserpentis*
235 methanotroph.

236

237 ***Distribution and relative abundance of thiotrophs and methanotrophs***

238 Symbiont specific probes designed to target the dominant thiotrophic and
239 methanotrophic phylotype hybridized to their respective bacterial targets in the gills
240 of *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* (Fig. 3A-C). Both symbionts were
241 detected in the apical part of the gill bacteriocytes, while the basal region and other
242 parts of the gills including the ciliated ends of the filaments showed no signal. The
243 rare methanotroph-related phylotype, found in the clone library from a single Menez
244 Gwen individual, was not detected with FISH in Lucky Strike and Rainbow mussels,
245 despite the design of 4 probes specific to this sequence. Unfortunately, no mussels

246 from Menez Gwen were fixed for FISH analyses so that it remains unclear if this
247 phylotype originated from a gill symbiont that only occurs in Menez Gwen mussels.

248 The distribution of the symbionts in the gill bacteriocytes was similar in
249 individuals from the same site, but differed between sites. In *Bathymodiolus azoricus*
250 from Rainbow (Fig. 3B), thiotrophs occurred in the apical region exposed to the
251 mantle fluid and methanotrophs were more basal within the bacteriocytes. Thiotrophic
252 and methanotrophic symbionts were more evenly distributed within bacteriocytes of
253 *B. azoricus* from Lucky Strike (Fig. 3A) and *B. puteoserpentis* from Logatchev (Fig.
254 3C). As with the distribution of the 2 symbionts, the relative abundance of the
255 methanotrophs and thiotrophs was similar between mussels from the same site, but
256 differed between vent sites. Methanotrophs were more abundant than thiotrophs in *B.*
257 *azoricus* from Rainbow (Fig. 3B). In contrast, *B. azoricus* from Lucky Strike had
258 more thiotrophs than methanotrophs (Fig. 3A), resembling *B. puteoserpentis* from
259 Snake Pit (Distel et al., 1995). The ratio of methanotrophs to chemoautotrophs in *B.*
260 *puteoserpentis* from Logatchev (Fig. 3C) was intermediate between the two *B.*
261 *azoricus* described above, but specimens of this population had more methanotrophs
262 than the previously described *B. puteoserpentis* from Snake Pit (Distel et al., 1995).

263 Symbiont distribution and relative abundance are clearly not host specific, as
264 in both *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* intraspecific differences were as distinct as
265 those between the 2 species. A comparison of symbiont distribution and relative
266 abundance to sulfide and methane concentrations in end-member fluids at the MAR
267 vent sites is shown in Table 2. Symbionts were distributed evenly throughout the
268 bacteriocytes at all sites except Rainbow, where methanotrophs were located in the
269 basal and thiotrophs in the apical region of the gill cells. This distribution pattern was
270 first observed in mussels from cold seeps on the Gabon continental margin and was

271 hypothesized to reflect the high ratio of methane over sulfide in the seep environment
272 (Duperron et al. 2005). Thiotrophs were assumed to be more dependent on being
273 close to the mantle fluids because of the low sulfide concentrations in the
274 environment while methanotrophs were assumed to be able to inhabit the basal region
275 because diffusive loss of methane through the bacteriocytes could be compensated for
276 by the higher methane concentrations. At Rainbow, sulfide and methane
277 concentrations were similar in end-member fluids, making the hypothesis used to
278 explain the uneven distribution of the symbionts in the Gabon seep mussels unlikely
279 for the Rainbow mussels. However, single measurements taken at one point and time
280 may not reflect average concentrations over longer times.

281 The Rainbow site was also the only one at which methanotrophs were more
282 abundant than thiotrophs, corresponding well with methane concentrations in end-
283 member fluids, which were higher at Rainbow than at other vent sites (Table 2).
284 Analogously, at the 2 sites with the highest sulfide concentrations and sulfide over
285 methane ratios, Lucky Strike and Snake Pit, thiotrophs were more abundant than
286 methanotrophs. At the Lucky Strike site, the higher abundance of thiotrophs was also
287 observed in earlier studies (Trask and van Dover, 1999; Fiala-Médioni et al., 2002)
288 showing that the dominance of thiotrophic symbionts in the gills of these mussels has
289 remained stable over time.

290 In summary, it appears as if vent chemistry affects the relative abundance of
291 thiotrophs and methanotrophs, as suggested in earlier studies using transmission
292 electron microscopy and stable isotope analysis (Trask and van Dover, 1999; Colaço
293 et al., 2002; Fiala-Médioni et al., 2002). In contrast, no clear effect of sulfide and
294 methane concentrations on symbiont distribution was observed in this study.
295 However, the relative concentrations of sulfide and methane in end-member fluids

296 may not be representative of their ratios in diffuse fluids that deliver these energy
297 sources to the mussels. For future studies, time series measurements of gradients in
298 vent fluids taken at the mussel collection sites should be combined with quantitative
299 studies of relative symbiont abundance, for example using slot blot hybridization with
300 thiotroph- and methanotroph-specific probes. The northern MAR vent sites, with their
301 distinct differences in vent chemistry, yet highly similar to identical *Bathymodiolus*
302 symbiont phylotypes provide an ideal study site for gaining a better understanding of
303 how gradients in energy sources at hydrothermal vents influence the nutritional
304 response of mussels with dual symbioses.

305

306

307 Acknowledgments

308 We thank the captains and crew, ROV pilots, and chief scientists of the cruises of the
309 ATOS, AT5-2 and Hydromar I cruises for their support and assistance in sample
310 collection. This research has been supported by grants from the German Research
311 Foundation (DU 419/1-1 in the Priority Program 1144 RIDGE), the Max Planck
312 Society, and the National Science Foundation (Biological Oceanography), and by the
313 International Max Planck Research School of Marine Microbiology Ph.D. program
314 (S.D. and F.Z.), Ifremer (S.D.), an NIH Genetics Training grant (Z.P.M), an NSF
315 Postdoctoral Fellowship in Microbial Biology (DBI-0400591; E.G.D), and a Hanse-
316 Wissenschaftskolleg Fellowship (C.M.C), which we gratefully acknowledge.

317

317 Amann, R., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A.
318 (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow
319 cytometry for analysing mixed microbial populations. *Appl. Env. Microbiol.*
320 **56**: 1919-1925.

321 Cavanaugh, C.M., Wirsén, C.O., and Jannash, H.W. (1992) Evidence for
322 methylophilic symbionts in a hydrothermal vent mussel (Bivalvia: Mytilidae)
323 from the Mid-Atlantic Ridge. *Appl. Env. Microbiol.* **58**: 3799-3803.

324 Cavanaugh, C.M., McKiness, Z. P., Newton, I. L. G. and Stewart, F.J. (2005) Marine
325 chemosynthetic symbioses. In *The Prokaryotes: an evolving electronic*
326 *resource for the microbiological community*. Dworkin, M.et.al. (eds).
327 Springer-Verlag, New York.

328 Cavanaugh, C.M., Levering, P.R., Maki, J.S., Mitchell, R., and Lidstrom, M.E. (1987)
329 Symbiosis of methylophilic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* **325**: 346-
330 347.

331 Colaco, A., Dehairs, F., Desbruyères, D., Le Bris, N., and Sarradin, P.M. (2002) $\delta^{13}\text{C}$
332 signature of hydrothermal mussels is related with the end-member fluid
333 concentration of H_2S and CH_4 at the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent
334 fields. *Cah. Biol. Mar.* **43**: 259-262.

335 Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A. et al. (2003)
336 The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that
337 allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucl. Acids Res.*
338 **31**: 442-443.

339 Craddock, C., Hoeh, W.R., Gustafson, R.G., Lutz, R.A., Hashimoto, J., and
340 Vrijenhoek, R.J. (1995) Evolutionary relationships among deep-sea mytilids

341 (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents and cold water methane/sulfide
342 seeps. *Mar. Biol.* **121**: 477 - 485.

343 DeChaine, E.G., and Cavanaugh, C.M. (2005) Symbioses of methanotrophs and deep-
344 sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae). In *Molecular Basis of Symbiosis*.
345 Overmann, J. (ed): Springer-Verlag, New York. In press.

346 Distel, D.L., and Cavanaugh, C.M. (1994) Independent phylogenetic origins of
347 methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine
348 bivalves. *J. Bacteriol.* **176**: 1932-1938.

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

352 Douville, E., Charlou, J. L., Oeklers, H., Biennu, P., JOve Colon, C. F., Donval, J.
353 P., Fouquet, Y., Prieur, D., Appriou, P. (2002) The Rainbow vent fluids
354 (36°14'N, MAR): the influence of ultramafic rocks and phase separation on
355 trace metal content in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fluids. *Chem. Geol.*
356 **184**: 37-48.

357 Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J.C., Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Amann, R.,
358 and Dubilier, N. Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* mussel from a methane
359 seep on the Gabon continental margin (South East Atlantic): 16S rRNA
360 phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Appl. Env. Microbiol.* **71**:
361 1694-1700.

362 Fiala-Médioni, A., McKiness, Z.P., Dando, P., Boulegue, J., Mariotti, A., Alayse-
363 Danet, A.M. et al. (2002) Ultrastructural, biochemical, and immunological
364 characterisation of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus*

365 *azoricus* from the Mid Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Mar.*
366 *Biol.* **141**: 1035-1043.

367 Fisher, C.R. (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine
368 invertebrates. *Rev. Aquat. Sci.* **2**: 399-613.

369 Fisher, C.R. (1993) *Oxidation of methane by deep-sea mytilids in the Gulf of Mexico*
370 *in Biochemistry of global change: radiative gases*. Chapman & Hull.

371 Fisher, C.R., and Childress, J.J. (1992) Organic carbon transfer from methanotrophic
372 symbionts to the host hydrocarbon-seep mussel. *Symbiosis* **12**: 221-235.

373 Fisher, C.R., Childress, J.J., Oremland, R.S., and Bidigare, R.R. (1987) The
374 importance of methane and thiosulphate in the metabolism of the bacterial
375 symbionts of two deep-sea mussels. *Mar. Biol.* **96**: 59-71.

376 Hall, T. (1997-2001) BioEdit. www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html

377 Jobb, G. (2005) TREEFINDER version June 2005. *Munich, Germany. Distributed by*
378 *the author at www.treefinder.de.*

379 Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar et al.
380 (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.* **32**:
381 1363-1371.

382 Maas, P.A.Y., O'Mullan, G.D., Lutz, R.A., and Vrijenhoek, R.C. (1999) Genetic and
383 morphometric characterization of mussels (Bivalvia: Mytilidae) from Mid-
384 Atlantic hydrothermal vents. *Biol. Bull.* **196**: 265-272.

385 Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O., and Jannash, H.W. (1995) Phylogenetic
386 relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea
387 hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S
388 rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164**: 165-172.

389 Nelson, D.C., Hagen, K.D., and Edwards, D.B. (1995) The gill symbiont of the
390 hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* is a psychrophilic,
391 chemoautotrophic, sulfur bacterium. *Mar. Biol.* **121**: 487-495.

392 O'Mullan, G.D., Maas, P.A.Y., Lutz, R.A., and Vrijenhoek, R.C. (2001) A hybrid
393 zone between hydrothermal vent mussels (Bivalvia: Mytilidae) from the Mid-
394 Atlantic Ridge. *Mol. Ecol.* **10**: 2819-2831.

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

398 Von Cosel, R. (2002) A new species of bathymodioline mussel (Mollusca, Bivalvia,
399 Mytilidae) from Mauritania (West Africa), with comments on the genus
400 *Bathymodiolus* Kenk & Wilson, 1985. *Zoosystema* **24**: 259 - 271.

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

404 Won, Y.J., Hallam, S.J., O'Mullan, D., Pan, I.L., Buck, K.R., and Vrijenhoek, R.C.
405 (2003) Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea
406 mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Appl. Env. Microbiol.* **69**: 6785-6792.

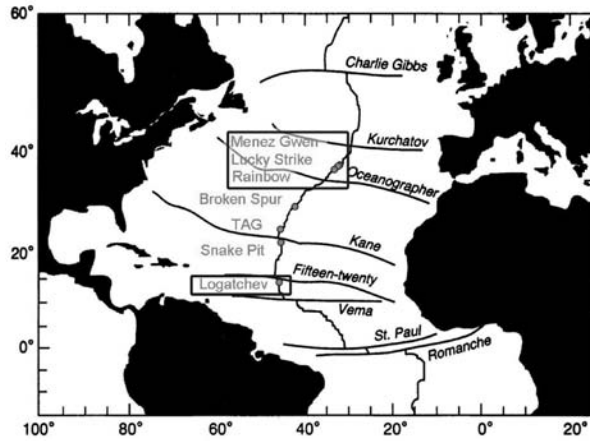


Fig.1: Hydrothermal vent sites on the northern MAR. Sites where mussels were collected for this study are framed. *B. azoricus* is found at Menez Gwen, Lucky Strike, and Rainbow, *B. puteoserpentis* at Snake Pit and Logatchev, and both species co-occur at Broken Spur (no mussels occur at TAG).

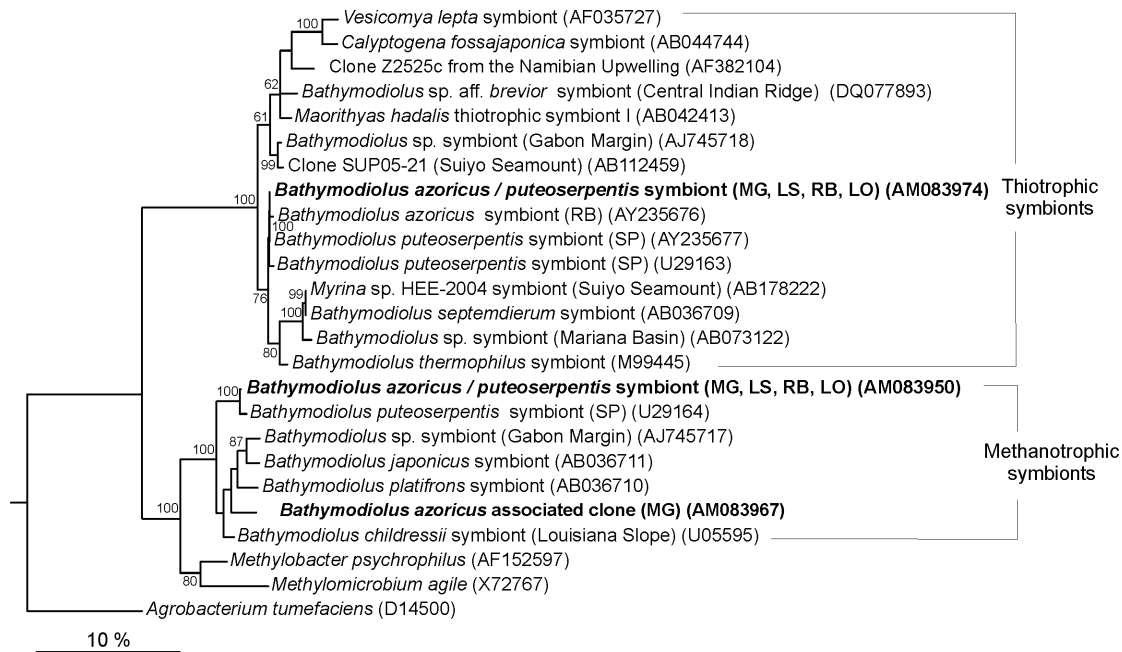


Fig. 2: Maximum likelihood tree based on 16S rRNA sequences from the thiotrophic and methanotrophic endosymbionts of bathymodioline mussels from the northern Mid-Atlantic Ridge (highlighted in bold) within the γ -Proteobacteria. *Agrobacterium tumefaciens* (α -proteobacteria) is included as an outgroup; 1309 nt positions were used; L = -5906. Bootstrap percentages obtained from 200 ML replicates (values > 60 shown). Scale bar represents 10% estimated nucleotide substitution.

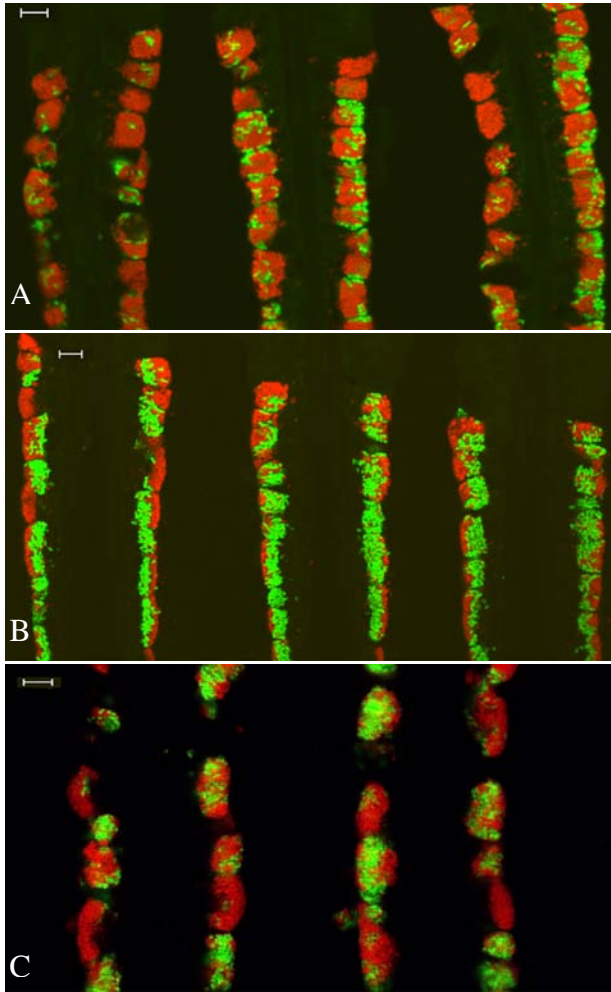


Fig. 3 A-C: Gill sections of *Bathymodiolus* specimens from the Mid-Atlantic Ridge hybridized with fluorescently-labeled probes specific to the methanotrophic symbiont (shown in green) and the thiotrophic symbiont (shown in red). Scale bars = 10 μm . A: *B. azoricus* from Lucky Strike. B: *B. azoricus* from Rainbow. C: *B. puteoserpentis* from Logatchev.

Table 1: Shared nucleotide substitutions in the thiotrophic and methanotrophic 16S rRNA phylotypes in *Bathymodiolus* mussels from the Menez Gwen (MG), Lucky Strike (LS), Rainbow (RB), and Logatchev (LO) vent sites. The rare methanotroph-related sequence found in only a single mussel from MG is not included in this table as it shows more than 3% sequence divergence to all other MAR methanotrophic symbiont sequences.

Thiotroph	Nucleotide position ^a			No. of sequences (out of 19 total)	No. of individuals
	1014	1015	1262		
Dominant phylotype (MG, LS, RB, LO)	T	T	C	18	10
Rare phylotype (RB) ^b	A	A	T	1	1

Methanotroph	Nucleotide position ^a		No. of sequences (out of 17 total)	No. of individuals
	73	82		
Dominant phylotype (MG, LS, RB)	A	C	5	5
Dominant phylotype (LO)	G	C	9	4
Rare phylotype (LO)	A	T	3	2

^aPosition based on *E. coli* numbering

^bThese 3 differences are shared with the rare thiotroph phylotype identified by Won et al. (2003) from a Rainbow mussel specimen (AY235676)

Table 2: Sulfide and methane concentrations and ratios in end-member fluids from the Lucky Strike (LS), Rainbow (RB), Snake Pit (SP) and Logatchev (LO) vent sites, and distribution and relative abundance of thiotrophic (SOX) and methanotrophic (MOX) symbionts in the gill cells of mussels based on qualitative FISH observations from this study (LS, RB, LO) and Distel et al. 1995 (SP). Chemical data is from Douville et al. 2002.

Site	Species	H ₂ S (mM)	CH ₄ (mM)	H ₂ S/CH ₄	Distribution	Relative abundance
LS	<i>B. azoricus</i>	0.6 - 3.4	0.5 - 1.0	1.2 - 3.4	mixed	SOX > MOX
RB		1.0 - 2.5	2.2 - 2.5	0.45 - 1.0	MOX basal	SOX < MOX
SP	<i>B. puteoserpentis</i>	2.7 - 6.1	0.05 - 0.06	54 - 102	mixed	SOX > MOX
LO		0.8	2.1	0.38	mixed	SOX ≈ MOX

3.2 – *Quelles bactéries sont associées à Bathymodiolus sp., une espèce de mytilidé associée aux sites de fluides froids de la marge du Gabon, et peut on mettre en évidence une réponse nutritionnelle ‘intrasite’ liée aux paramètres chimiques mesurées lors de la collecte ?*

Article ‘Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (South East Atlantic) : 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbiontes in the gills

Duperron S., T. Nadalig, J. C. Caprais, M. Sibuet, A. Fiala-Médioni, R. Amann, N. Dubilier

Publié en 2005 dans *Applied and Environmental Microbiology* 71(4) pp 1694-1700.

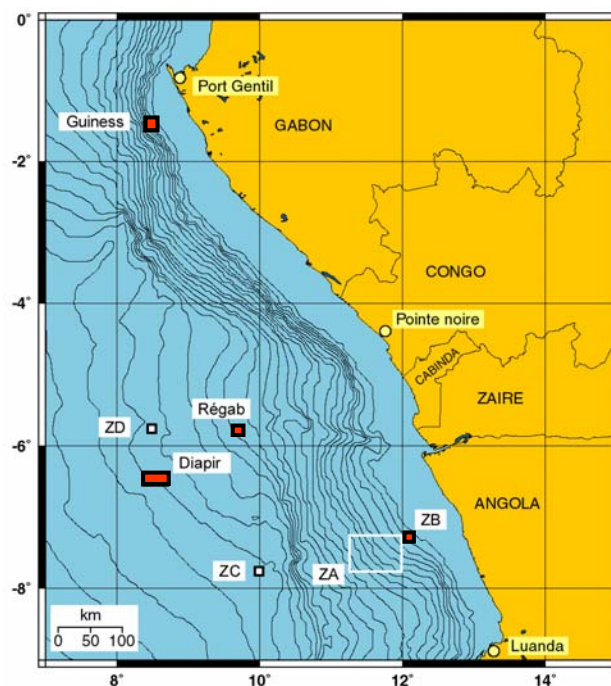
L'étude précédente a permis de proposer l'hypothèse d'une réponse nutritionnelle de la symbiose en fonction des caractéristiques du fluide hydrothermal, et de valider notre approche dans l'examen de la symbiose et de sa variation. Cependant, les données sur la chimie des fluides ont été obtenues dans la littérature, et non lors de la collecte des échantillons, et aucune donnée relative à l'environnement immédiat des mytilidés n'a été collectée.

L'étude présentée ici a été réalisée à la suite de la découverte de denses communautés d'organismes probablement symbiotiques dominées par une espèce de *Bathymodiolus* non décrite sur le site Régab, un pockmark d'environ 800 mètres de diamètre situé à 3160 mètres de profondeur à l'écart du delta profond du fleuve Zaïre au cours des campagnes ZaiROV et Biozaire (Sibuet et al. 2002) (voir carte page suivante). Au cours de la campagne Biozaire 2, des échantillons d'eau ont été collectés au voisinage immédiat des agrégats de mytilidés afin de mesurer les concentrations en méthane et en sulfures et de caractériser cet environnement. Les mytilidés ont ensuite été collectés, disséqués à bord, et leurs symbiontes caractérisés par séquençage de leur ARNr 16S et par microscopie électronique à transmission. L'hybridation de sondes fluorescentes spécifiques (FISH) sur différentes zones des branchies d'un même individu, ainsi que sur les branchies d'individus collectés au sein d'agrégats caractérisés par des concentrations différentes de méthane a permis de comparer les abondances de bactéries, en les reliant à une variabilité de l'environnement.

Bathymodiolus sp. est associé à deux gamma protéobactéries, l'une proche des symbiontes méthanotrophes de mytilidés, l'autre d'une séquence environnementale relativement proche, mais distincte, du groupe monophylétique formé par les symbiontes sulfoxydants de mytilidés. La séquence de cette bactérie sulfoxydante est la première obtenue pour un mytilidé vivant sur un site de fluides froids, et cette différence conduit à se poser des

questions sur l'évolution des doubles symbioses. *Bathymodiolus* sp. est seulement la cinquième espèce chez laquelle la double symbiose est identifiée, et la première dans l'hémisphère sud, qui a toutefois été très peu exploré.

Les observations par la méthode FISH ont montré une zonation des symbiontes à l'intérieur des bactériocytes, les bactéries sulfoxydantes étant localisées à l'apex de ces cellules, au plus près du fluide, tandis que les méthanotrophes sont plus basales. Cette observation pourrait s'expliquer par l'absence de sulfures dans l'eau environnant les moules (<1µM), tandis que le méthane y est plus abondant (0.7 à 33.7 µM). L'abondance relative des deux types de symbiontes ne varie pas de manière détectable entre les parties antérieure, médiane et postérieure d'une branchie. De même, elle ne varie pas entre individus provenant d'agrégats différents, en dépit d'une variation considérable de la concentration en méthane (un facteur 50 entre l'agrégat le plus riche et le plus pauvre). Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer cette absence de variation, comme l'absence de conditions limitantes pour la croissance des méthanotrophes même sur l'agrégat le plus pauvre en méthane, ou l'existence de variations temporelles importantes des concentrations de méthane dont nos mesures ponctuelles ne peuvent rendre compte, et qui homogénéiseraient les concentrations de méthane entre agrégats sur le long terme.



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

Sébastien Duperron,^{1,2} Thierry Nadalig,¹† Jean-Claude Caprais,¹ Myriam Sibuet,¹
Aline Fiala-Médioni,³ Rudolf Amann,² and Nicole Dubilier^{2*}

IFREMER Département Environnement Profond, Centre de Brest, Plouzané,¹ and Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer,³ France, and Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany²

Received 28 June 2004/Accepted 25 October 2004

Deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) harbor symbiotic bacteria in their gills and are among the dominant invertebrate species at cold seeps and hydrothermal vents. An undescribed *Bathymodiolus* species was collected at a depth of 3,150 m in a newly discovered cold seep area on the southeast Atlantic margin, close to the Zaire channel. Transmission electron microscopy, comparative 16S rRNA analysis, and fluorescence in situ hybridization indicated that this *Bathymodiolus* sp. lives in a dual symbiosis with sulfide- and methane-oxidizing bacteria. A distinct distribution pattern of the symbiotic bacteria in the gill epithelium was observed, with the thiotrophic symbiont dominating the apical region and the methanotrophic symbiont more abundant in the basal region of the bacteriocytes. No variations in this distribution pattern or in the relative abundances of the two symbionts were observed in mussels collected from three different mussel beds with methane concentrations ranging from 0.7 to 33.7 μM . The 16S rRNA sequence of the methanotrophic symbiont is most closely related to those of known methanotrophic symbionts from other bathymodiolid mussels. Surprisingly, the thiotrophic *Bathymodiolus* sp. 16S rRNA sequence does not fall into the monophyletic group of sequences from thiotrophic symbionts of all other *Bathymodiolus* hosts. While these mussel species all come from vents, this study describes the first thiotrophic sequence from a seep mussel and shows that it is most closely related (99% sequence identity) to an environmental clone sequence obtained from a hydrothermal plume near Japan.

Symbiotic associations with thiotrophic (sulfur-oxidizing) and methanotrophic (methane-oxidizing) bacteria occur in a wide array of animal species that live in reducing environments with high sulfide and methane concentrations, such as hydrothermal vents, whale skeletons, sunken wood, and cold seeps (4, 6, 11, 13, 15, 40). Cold seeps occur worldwide on both active and passive margins (39), and these ecosystems harbor a high proportion of invertebrates associated with symbiotic bacteria (34), including highly specialized annelids (Siboglinidae), as well as bivalve clams (Thyasiridae, Vesicomidae, Lucinidae) and bathymodiolid mussels (Mytilidae).

Mussels of the genus *Bathymodiolus* are found worldwide in vents and seeps at depths from 400 to 3,600 m (41). The bacterial symbionts occur in specialized cells of the gill called bacteriocytes (13, 15) and have been characterized in about 10 of the 22 known species by using transmission electron microscopy (TEM), stable isotopes, enzymology, and molecular analyses (5, 7, 10, 14, 16, 30, 31, 37). Some species, like *Bathymodiolus thermophilus* from east Pacific vents, harbor only thiotrophic bacteria, while others, like *Bathymodiolus chil-*

dressii from the Gulf of Mexico, have only methanotrophic symbionts (6). A dual symbiosis, in which a single host harbors both thiotrophic and methanotrophic bacteria, has been described for four species, two from cold seeps in the Gulf of Mexico (*Bathymodiolus brooksii* and *Bathymodiolus heckerae*) (5, 16) and two from vents along the Mid-Atlantic Ridge (*Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis*) (10, 14). The following data have been presented as evidence for the presence of dual symbionts in these species. Two distinct morphotypes have been shown to cooccur within the bacteriocytes by using TEM (5, 10, 14, 16). Enzyme assays and immunohistochemistry analyses have confirmed the presence of enzymes used by thiotrophic and methanotrophic bacteria (5, 14, 16, 30). Stable isotope analyses of gill tissues (5, 7, 16, 37) and lipid biomarkers (31) indicated that methanotrophy and thiotrophy are sources of nutrition, with filter feeding a possible further source, as a functional gut is still present in most bathymodiolids (29). Phylogenetic evidence for dual symbiosis so far only exists for *B. puteoserpentis* from the Mid-Atlantic Ridge (10). By using comparative 16S rRNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization (FISH), two distinct γ -proteobacterial phylotypes were shown to coexist within the host bacteriocytes, and the thiotrophic and methanotrophic symbionts were most closely related to the symbionts of mussels harboring only a single symbiont phylotype (10).

While symbiotic invertebrates obtained from vent and seep sites in the north Atlantic have been described, symbioses of vent or seep invertebrates from the south Atlantic have not

* Corresponding author. Mailing address: Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany. Phone: 49 (0)4212028932. Fax: 49 (0)4212028580. E-mail: ndubilier@mpi-bremen.de.

† Present address: Université Louis Pasteur (Strasbourg), Laboratoire de Dynamique, Evolution et Expression de Génomes de Microorganismes, CNRS FRE 2326, Institut de Botanique, Strasbourg, France.

TABLE 1. Numbers of partial sequences (from nucleotide 518 to nucleotide ~1,000 based on *E. coli* numbering) and nearly full sequences (~1,500 nucleotides) obtained from cloned PCR products amplified from gill DNA of three *Bathymodiolus* sp. specimens

Specimen source	No. of partial sequences				No. of full sequences		
	Thiotrophs	Methanotrophs	Chimeras	Total	Thiotrophs	Methanotrophs	Total
M1	40	19	0	59	1	2	3
M2	57	0	1	58	2	0	2
M3	39	10	2	51	1	1	2
Total	136	29	3	168	4	3	7

been described previously. The discovery of a large active pockmark area (depth, 3,150 m) on the Gabon margin (south-east Atlantic) (28) provided the opportunity to study a possible new *Bathymodiolus* species (R. von Cosel, personal communication). Mussels up to 175 mm long form dense beds and dominate the macrofaunal community at this site (3). In this study, the morphology of symbiotic bacteria in this *Bathymodiolus* sp. was investigated by using TEM, the identities and phylogenetic relationships of the bacteria were determined by comparative 16S rRNA analysis, and the distribution of the bacteria was characterized by FISH. Measurement of methane and sulfide concentrations within mussel beds prior to specimen collection provided an ecological basis for comparing different habitats.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and storage. *Bathymodiolus* sp. individuals were collected with the remotely operated vehicle VICTOR 6000 during the Biozaire 2 cruise (2001; IFREMER; sponsored by Total; chief scientist, Myriam Sibuet) to the Congo-Angola-Gabon margin, close to the Zaire channel (equatorial east Atlantic). Specimens were collected at a depth of 3,150 m from three mussel beds (mussel beds M1, M2 and M3) in a pockmark area called Régab (05°52.8134'S, 009°37.9419'E). Mussel beds M2 and M3 were 30 m from each other, while M1 was about 130 m from both M2 and M3. Specimens were collected at the center of mussel beds M1 to M3 and at the periphery of mussel bed M3. All specimens were prepared in the following manner. One gill of each mussel was fixed for transmission electron microscopy (see below). The other gill was divided into two parts, one of which was immediately frozen in liquid nitrogen and the other of which was fixed for FISH (see below).

Methane and sulfide measurements. Seawater samples for determination of methane and sulfide concentrations were collected a few minutes before mussel samples were collected from the center of each of the three mussel beds (mussel beds M1, M2, and M3) and at the periphery of mussel bed M3. At each of these four collection sites, two replicate samples were taken at the bottom of the mussel bed with a syringe inserted into the bed and positioned 2 to 3 cm above the seafloor, and two replicate samples were taken just above the top of the mussel bed, where the mussels were surrounded by seawater. Methane concentrations were measured by gas chromatography by using headspace injection (33), and sulfide concentrations were determined photometrically by the method described by Fonselius (19).

Transmission electron microscopy. Gill pieces from eight individuals were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.4 M NaCl buffered with 0.1 M cacodylate (pH 7.4) for 2 h and were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h in the same buffer. Fixed gills were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Araldite. Semithin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined with an HITACHI H-7500 transmission electron microscope.

DNA extraction. DNA was extracted individually from gill tissues of three mussels, one from each site, by the method described by Zhou et al. (44) by using proteinase K for cell digestion and a standard chloroform-isoamyl alcohol extraction procedure. DNA was precipitated in isopropanol, washed with ethanol, resuspended in sterile-filtered water, and stored in aliquots at -20°C.

16S rRNA PCR amplification. Bacterial 16S rRNA was amplified from gill tissue DNA by using the universal bacterial primers 8F and 1492R (26). The reaction mixture contained 50 pmol of each primer, 5 µg of bovine serum

albumin, 2.5 µmol of each deoxynucleoside triphosphate, 1× ExTaq buffer, and 1 U of *Taq* polymerase (TaKaRa, Otsu, Japan), and the volume was adjusted with sterile water to 50 µl. An initial denaturation step (96°C for 5 min) was followed by 25 cycles of 94°C for 1 min, 45°C for 1 min, and 72°C for 3 min and a final elongation step at 72°C for 5 min. PCR bias was minimized by using only 25 amplification cycles (32) and pooling four separate PCRs for each mussel. Amplified DNA was purified with a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

Cloning and sequencing. PCR products of the correct size (~1,500 bp) were cloned with a TOPO-TA kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). A 16S rRNA clone library was constructed for each of the three mussels. The insert size of white *Escherichia coli* colonies was controlled after lysis of the cells in cracking buffer (0.1 M NaOH, 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 10% glycerol) and analysis of the supernatant by gel electrophoresis. Positive clones were grown overnight in 1.5 ml of Luria-Bertani medium, and plasmids were prepared from the pelleted cells with a QIAprep Miniprep kit (QIAGEN). For each of the three individuals, 51 to 59 clones were sequenced partially (~500 bp) in a variable region of the 16S rRNA (*E. coli* positions 518 to ~1,000). After alignment with BioEdit (22), manual correction, elimination of three chimeras by using ChimeraCheck (8), and visual examination of the alignments, seven representative clones were fully sequenced in both directions (Table 1). Sequencing reactions were performed by using ABI BigDye and an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

Phylogenetic reconstruction. Sequences were compared with the database by using BLAST (1), and highly similar sequences were included in the analysis. Sequences were aligned with ARB (25) and were manually corrected. Preliminary analyses of the seven full sequences were performed by distance and parsimony methods by using the PHYLIP package (12) to select an appropriate data set (choice and number of sequences and positions). For the selected data set 36 sequences were used, but only 23 of these sequences are shown in Fig. 2 (the accession numbers of the sequences not shown in Fig. 2 are AF035728, AF035723, AF035727, AF035721, AB044744, X72767, AY029915, L34955, U77481, U62131, L40809, AF069959, and U11021). The 36 sequences were analyzed by the maximum-likelihood method with TREEFINDER (23) by using a general time reversible model and an eight-category discrete approximation of a Γ distribution (estimated α , 0.209) to account for among-site evolutionary rate heterogeneity. Maximum-likelihood bootstrap values were obtained from 1,000 replicates analyzed by the same method.

FISH. Two mussels from each collection site (center of mussel beds M1, M2, and M3 and periphery of mussel bed M3) were fixed for FISH in 2% formaldehyde in sterile seawater at 4°C for 2 h. After two washes in 1× phosphate-buffered saline (10 mM sodium phosphate, 130 mM NaCl), samples were stored at -20°C in 0.5× phosphate-buffered saline-50% ethanol (1:1). Fixed gill fragments were dehydrated in an increasing ethanol series and xylene before they were embedded in paraffin. Transverse sections (thickness, 4 µm) were cut with an RM 2165 microtome (Leica, Wetzlar, Germany) and collected on Superfrost slides (Fisher, Pittsburgh, Pa.) coated with 3-aminopropyltriethoxysilane. Paraffin was removed from the sections with xylene (three 10-min treatments), and the sections were rehydrated in a decreasing ethanol series, permeabilized for 10 min in 0.2 M HCl, rinsed for 10 min in 20 mM Tris buffer (Tris-HCl, pH 8), permeabilized again for 5 min at 37°C in Tris buffer containing 0.5 µg of proteinase K ml⁻¹, and rinsed for 10 min in 20 mM Tris buffer. After air drying, the sections were circled with a Pap Pen (G. Kisker, Mühlhausen, Germany). Hybridization was performed in preheated chambers containing tissue wetted with hybridization buffer (0.9 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.01% SDS, 30% formamide). The circled sections were covered with a mixture containing 100 ng of probe in 30 µl of hybridization buffer and incubated for 3 h at 46°C. The slides were washed in a buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.0001% SDS, 5 mM EDTA) at 48°C for 15 min, rinsed with MilliQ water, air dried, and covered with

TABLE 2. Methane and sulfide concentrations in the water collected at the bottom and top of three mussel beds and numbers of individuals and gill filament sections examined at each sampling site by fluorescence in situ hybridization

Mussel bed	Concn (μM) of ^a :				No. of specimens	Total no. of sections
	CH ₄ (bottom)	CH ₄ (top)	H ₂ S (bottom)	H ₂ S (top)		
M1 (center)	0.7	1.6	<1	<1	2	10
M2 (center)	33.7	23.2	<1	<1	2	5
M3 (center)	23.7	12.5	<1	<1	2	4
M3 (periphery)	11.8	6.3	<1	<1	2	24

^aThe detection limit for methane was 50 nM, and the detection limit for sulfide was 1 μM .

VectaShield (Vector, Burlingame, Calif.) and a coverslip. A total of 43 gill sections obtained from eight mussels collected from the four different sites (Table 2) were visually examined for differences in relative symbiont abundance by using an LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Jena, Germany).

A specific probe was designed for each of the two 16S rRNA phylotypes found in *Bathymodiolus* sp. by using the PROBE_DESIGN function of ARB, and the specificity was checked by using BLAST. The probe specific for the methanotrophic symbiont, BangM-138 (5'-ACCAGGTTGTCCOCCACTAA-3'), was labeled with Cy3 (Thermo, Waltham, Mass.), and the probe specific for the thiotrophic symbiont, BangT-642 (5'-CCTATACTCTAGCTTGCCAG-3'), was labeled with Cy5 (Biomers.net, Ulm, Germany). Gills of the dual-symbiont mussel *B. azoricus* were used to test the specificity, as the thiotrophic and methanotrophic symbionts of this mussel have a 1-bp mismatch in the 16S rRNA region targeted by the probes designed for this study. Both the BangM-138 probe and the BangT-642 probe were highly specific with 30% formamide, as no signal was observed in *B. azoricus* gill sections, while a strong signal was visible in *Bathymodiolus* sp. gill sections. The general *Bacteria* probe EUB338 (2) was used as a positive control, and the NON338 (42) probe was used as a negative control (both were labeled with Cy3).

Nucleotide sequence accession numbers. The EMBL accession numbers for the two sequences described in this paper are AJ745717 (methanotrophic symbiont) and AJ745718 (thiotrophic symbiont).

RESULTS

Methane and sulfide concentrations in the mussel beds. The methane concentrations measured at the bottom of mussel beds M2 and M3 close to the seafloor were in the same range (33.7 and 23.7 μM , respectively) and decreased at the top of the beds by 30% at mussel bed M2 and by 47% at mussel bed M3 (Table 2). At the bottom of the M1 mussel bed, the methane concentrations were 33- to 48-fold lower (0.7 μM) than they were at the bottom of the two other beds, and the concentration increased slightly at the top of mussel bed M1 to 1.6 μM . At the periphery of the M3 mussel bed, the methane concentrations both at the bottom and at the top of the bed were 50% lower than the concentration at the center of this mussel bed (Table 2). The sulfide concentrations were below the detection limit (1 μM) at all sampling sites. No obvious differences in mussel biomass were observed for mussel beds M1, M2, and M3.

Transmission electron microscopy. Bacteria were abundant in the apical half of the gill bacteriocytes, and numerous phagolysosome-like bodies occurred in the basal region of the cells (Fig. 1A). Two distinct bacterial morphotypes coexisted within each bacteriocyte (Fig. 1B). The smaller morphotype (0.42 ± 0.07 by 0.33 ± 0.06 μm) was a rod-shaped or coccoid bacterium, and the larger morphotype (1.23 ± 0.16 by 1.07 ± 0.10 μm) was coccoid with stacked membranes in its cytoplasm. In almost all bacteriocytes examined, the smaller mor-

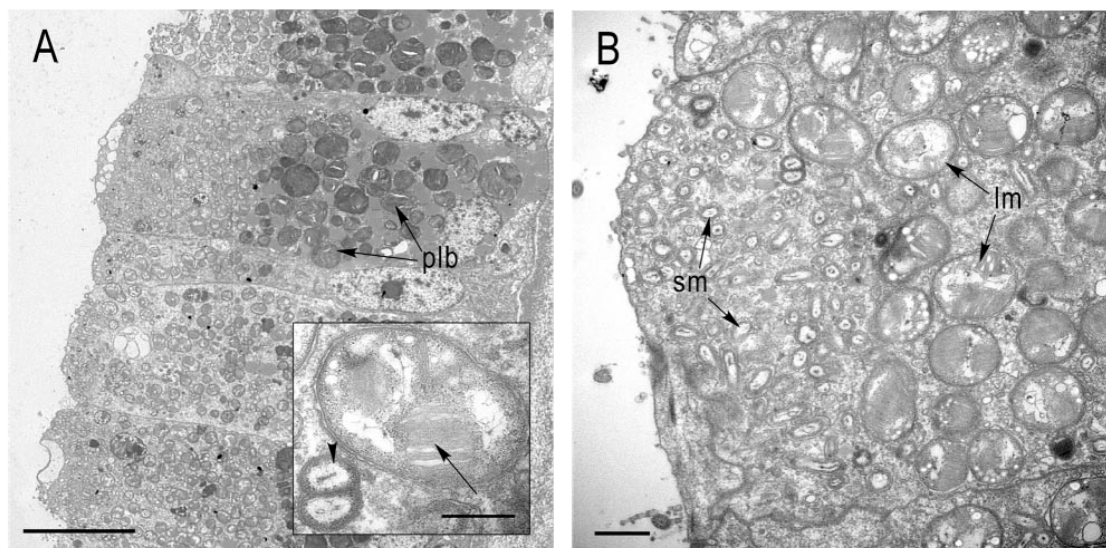


FIG. 1. Transmission electron micrographs of *Bathymodiolus* sp. gill sections with endosymbiotic bacteria. (A) Transverse section showing an overview of a bacteriocyte (plb, phagolysosome-like bodies). Scale bar = 10 μm . (Inset) Large morphotype with stacked internal membranes (arrow) and a dividing stage of the small morphotype (arrowhead). Scale bar = 0.5 μm . (B) Apical part of a bacteriocyte showing the distinct distribution of the two morphotypes. The smaller morphotype (sm) occupies the apical part of the bacteriocyte toward the mantle fluid, while the larger morphotype (lm) is located more basally. Scale bar = 1 μm .

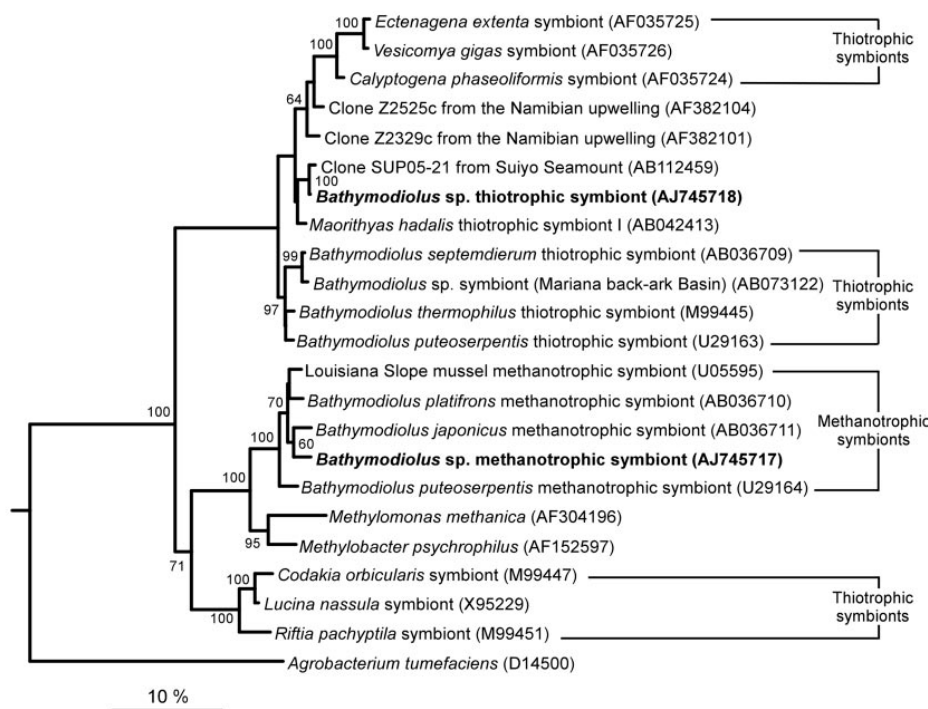


FIG. 2. Phylogenetic relationships, based on maximum-likelihood analyses of 16S rRNA sequences, of the thiotrophic and methanotrophic endosymbionts of *Bathymodiolus* sp. (boldface type) in the γ -Proteobacteria (1,266 sites analyzed; $L = -8,744$). Two α -proteobacterial species were used as an outgroup (only *A. tumefaciens* is shown). Bootstrap percentages were obtained by using 1,000 maximum-likelihood replicates, and values greater than 60% are indicated at the nodes. Scale bar = 10% estimated base substitutions.

phototype was most abundant in the apical region of the cell (Fig. 1B), while the larger morphotype occurred more basally.

16S rRNA phylogeny of the symbionts. Comparative 16S rRNA sequence analysis of 165 clones from three *Bathymodiolus* sp. individuals revealed two distinct bacterial phylotypes (Table 1). The sequence variation within each phylotype was very low (0 to 0.2%). Phylogenetic trees constructed from a variety of data sets and by using a variety of methods displayed topologies almost identical to that of the maximum-likelihood tree shown in Fig. 2. Both phylotypes clustered in the γ -Proteobacteria subdivision. One phylotype belongs to a monophyletic group that includes all known sequences of methanotrophic symbionts associated with bathymodiolid hosts (from the Gulf of Mexico, the Mid-Atlantic Ridge, and Japan). Its closest relative (97.8% identity) is the methanotrophic symbiont of *Bathymodiolus japonicus* from vents in the Okinawa Trough, near Japan (21).

The second *Bathymodiolus* sp. phylotype belongs to a large clade that includes thiotrophic symbionts associated with bivalves belonging to three families (Vesicomidae, Thyasiridae, and Mytilidae), as well as three environmental sequences, clones ZA2525c and ZA2329c from an upwelling zone off the coast of Namibia and clone SUP05 from the Suiyo Seamount hydrothermal plume, south of Japan (36). The second *Bathymodiolus* sp. phylotype is most closely related to the SUP05 clone (99.3% identity). Among symbiotic bacteria, its sequence is more similar to the sequence of symbiont I from the thyasirid

Maorithyas hadalis (97.8%) (20) than to any of the four previously published sequences for thiotrophic symbionts of bathymodiolid mussels (<97.4%). As determined by all three treeing methods, this sequence never fell within the well-supported monophyletic group of sequences from thiotrophic mussel symbionts (maximum-likelihood bootstrap value, 97.0). Instead, it formed a weakly supported monophyletic group with clone SUP05, *M. hadalis* symbiont I, and the symbionts of vesicomids (maximum-likelihood bootstrap value, <60). Therefore, except for its closest relative, clone SUP05, the exact phylogenetic position of the second *Bathymodiolus* sp. phylotype remains unclear.

FISH. Hybridization with gill tissue sections by using specific probes confirmed the coexistence of the two symbionts in the gill bacteriocytes (Fig. 3). The probe specific for the methanotroph-related sequence (BangM-138) hybridized to large coccoid bacteria assumed to be the large morphotype observed by TEM. The probe specific for the thiotroph-related sequence (BangT-642) hybridized to bacteria similar in size and shape to the smaller TEM morphotype.

A nonquantitative, visual comparison of gill sections from two individuals collected from each of the mussel beds (center of mussel beds M1, M2, and M3 and periphery of mussel bed M3) revealed a distinct distribution of the two symbiont phylotypes in most sections (34 of 43 sections examined) (Table 1). The methanotroph-related symbionts occurred in the more basal region of the bacteriocytes, while the thiotroph-related

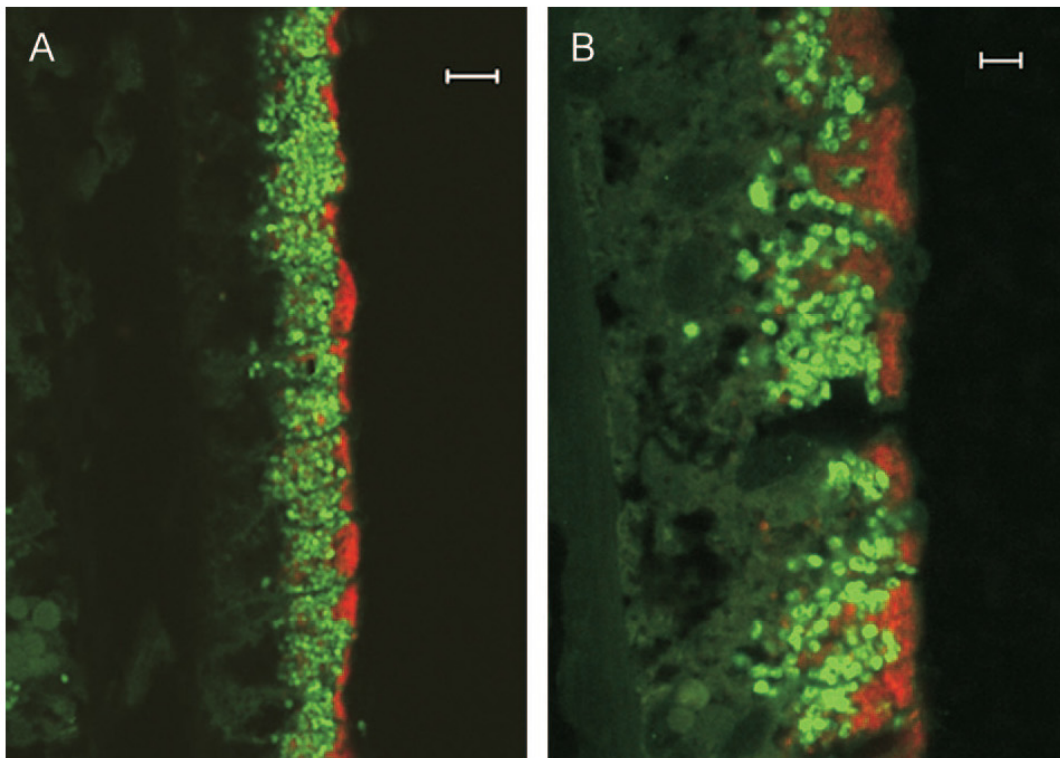


FIG. 3. Fluorescence in situ hybridization images of *Bathymodiolus* sp. symbionts in gill filaments. The thiotrophic symbionts (red) occupy the apical region of the bacteriocytes, while the methanotrophic symbionts (green) are located more basally. (A) Scale bar = 10 μm . (B) Scale bar = 5 μm .

symbionts consistently occupied the apical end of the bacteriocytes exposed to the environment (Fig. 3B). The most apical part of the bacteriocytes (width, 1 to 3 μm) was often almost exclusively occupied by the thiotroph-related symbionts. No obvious differences in the distribution and relative amounts of the thiotroph- and methanotroph-related symbionts were observed among gill sections of *Bathymodiolus* sp. collected from mussel beds M1 to M3.

DISCUSSION

The *Bathymodiolus* sp. mussels studied here from the Gabon margin harbor two morphologically distinct bacteria that resemble the methanotrophic (5, 14, 16) and thiotrophic (13, 17) symbionts of other *Bathymodiolus* species. Comparative 16S rRNA sequence analysis and FISH confirmed that *Bathymodiolus* sp. lives in a dual symbiosis with bacteria related to methane- and sulfide-oxidizing symbionts.

As expected, the *Bathymodiolus* sp. methanotroph 16S rRNA sequence falls within the monophyletic clade that includes all known methanotrophic symbionts of bathymodiolid mussels (9, 10, 21). In contrast, the phylogenetic position of the *Bathymodiolus* sp. thiotroph 16S rRNA sequence is surprising, because the sequence does not fall in the monophyletic group of thiotrophic symbionts from all other *Bathymodiolus* hosts (9, 10, 21). This monophyletic group consists exclusively of thio-

trophic symbionts from hydrothermal vent mussels (from the Mid-Atlantic Ridge, the East Pacific Rise, and the western Pacific), while the thiotroph sequence obtained in this study is the first thiotroph sequence from a cold-seep mussel. A further unexpected result is the close relationship of the *Bathymodiolus* sp. thiotrophic symbiont to the environmental clone sequence SUP05 (36) and the placement of two environmental clone sequences obtained from surface waters off the Namibian coast (accession no. AF382104 and AF382101) (Fig. 2) in the *Bathymodiolus-Vesicomya/Calyptogena* clade. In all previous analyses this clade consisted exclusively of clam and mussel symbionts (9, 10, 20, 21).

One explanation for the lack of monophyly for vent and seep mussel thiotrophs is that the symbioses may have evolved independently of each other. It is intriguing that in a recent study of vent mussels from the Mid-Atlantic Ridge acquisition of the thiotrophic symbiont from the environment was suggested (43). Uptake of a free-living bacterial species from the environment is one way in which these associations could have developed independently during convergent evolution. However, environmental symbiont transmission is not necessarily a good indication of convergent evolution as some symbioses in which environmental transmission occurs have clearly been established through cospeciation, like the symbiosis between luminescent *Vibrio* bacteria and squid (27).

An alternative explanation for the lack of monophyly for the thiotrophic symbionts of *Bathymodiolus* sp. and the thiotrophic symbionts of vent mussels is that there is indeed a sister group relationship between them, but sequences that could allow resolution of this relationship are not yet known. In this case a single acquisition event would have occurred, with consequent speciation leading to separation of vent and seep mussels, followed by diversification in the two environments. Clearly, sequences from additional mussel species and related free-living bacteria are needed to fully resolve the evolutionary history of *Bathymodiolus* symbioses.

Ecology of the *Bathymodiolus* sp. symbiosis. Sulfide and methane gradients over time and space are assumed to play a major role in determining the distribution, biomass, and productivity of symbiotic invertebrates at vents and seeps (18, 34, 35). However, little is known about how variations in these energy sources affect the nutrition of hosts living in dual symbioses with sulfide- and methane-oxidizing bacteria. Previous studies of Mid-Atlantic Ridge mussels with dual symbionts indicated that there is a nutritional response to fluid gradients, with an increase in the relative amounts of sulfide oxidizers and reliance on thiotrophy in mussels from sites with higher sulfide concentrations and, correspondingly, an increase in the relative amounts of methane oxidizers and reliance on methanotrophy in mussels exposed to higher methane concentrations (7, 37). In this study, no variations in the relative amounts of thiotrophic and methanotrophic symbionts were observed in *Bathymodiolus* sp., despite a nearly 50-fold difference in methane concentrations between sample sites. One explanation for this unexpected result is that even at the lowest concentration (0.7 μM), methane may not be limiting for the growth of the methanotrophic symbionts. Alternatively, the nonquantitative methods used here may not have been sufficient to recognize small differences in relative symbiont amounts. A further important consideration is that the snapshot quality of the one-time methane and sulfide measurements may not reflect the average concentrations over longer times, as some studies have indicated that seepage fluxes can vary greatly not only over space but also over time (24, 34, 38).

The site-independent distribution of the *Bathymodiolus* sp. symbionts within each bacteriocyte, with the thiotrophs occupying a more apical position than the methanotrophs, has not been described previously. The closer proximity of the thiotrophic symbionts to the apical edge of the bacteriocytes suggests that these bacteria are more dependent on exchange with the mantle fluids that contain seawater from the environment. Intriguingly, the sulfide concentrations in the seawater at the collection site were much lower than the methane concentrations. Thus, low sulfide concentrations could limit the distribution of the thiotrophs to the regions closest to the circulating mantle fluids, where sulfide is more readily available. Correspondingly, the methanotrophs are able to inhabit a more basal region of the bacteriocytes, because diffusive loss of methane through the bacteriocytes is compensated for by higher methane concentrations. While FISH has not been used previously to obtain a general overview of symbiont distribution, ultrastructural analyses of other *Bathymodiolus* species have revealed a more regular distribution of methanotrophs and thiotrophs throughout the bacteriocyte (10, 14, 16, 43).

This study shows the importance of examining physicochem-

ical parameters, such as sulfide and methane concentrations, at spatial and temporal scales relevant to the organisms living in cold seeps. Time series measurements of gradients of these parameters and correlation with symbiont distribution, relative amounts, and biomass are needed to obtain a better understanding of the influence of the environment on the relationships established in nature between hosts and their symbiotic bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the pilots and crew of the N/O *L'Atalante* and the ROV *Victor 6000* for efficient cooperation during the Biozaire 2 cruise (2001; IFREMER; chief scientist, Myriam Sibuet). We thank Karine Olu, Alexis Fifis, and Ann Andersen for the maps of macrofaunal communities, for on-board dissections, and for sample preparation, and R. Von Cosel is acknowledged for providing unpublished taxonomic results. The technical assistance of B. Rivière and D. Saint-Hilaire with microscopy and sectioning is gratefully acknowledged. We also thank Claudia Bergin, Anna Blazejak, and Silke Wetzel for great technical assistance with molecular methods.

We thank the oil and gas company Total for sponsoring the Biozaire project. S.D. is a student in the International Max Planck Research School of Marine Microbiology Ph.D. program, and his grant is co-funded by IFREMER and MPI. This work was supported by the Max Planck Society, IFREMER, University Pierre-et-Marie Curie, and CNRS (UMR 7621).

REFERENCES

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.
- Amann, R., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919–1925.
- Andersen, A., S. Hourdez, B. Marie, D. Jollivet, F. H. Lallier, and M. Sibuet. *Escarpia southwardae* sp. nov., a new species of vestimentiferan tubeworm (Annelida, Siboglinidae) from West African cold seeps. *Can. J. Zool.* 82: 980–999.
- Cavanaugh, C. M., S. L. Gardiner, M. L. Jones, H. W. Jannasch, and J. B. Waterbury. 1981. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213:340–342.
- Cavanaugh, C. M., P. R. Levering, J. S. Maki, R. Mitchell, and M. E. Lidstrom. 1987. Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* 325:346–347.
- Childress, J. J., C. R. Fisher, J. M. Brooks, M. C. Kennicutt II, R. Bidigare, and A. E. Anderson. 1986. A methanotrophic marine molluscan (*Bivalvia*, Mytilidae) symbiosis: mussels fueled by gas. *Science* 233:1306–1308.
- Colaço, A., F. Dehairs, D. Desbruyères, N. Le Bris, and P. M. Sarradin. 2002. $\delta^{13}\text{C}$ signature of hydrothermal mussels is related with the end-member fluid concentration of H_2S and CH_4 at the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Cah. Biol. Mar.* 43:259–262.
- Cole, J. R., B. Chai, T. L. Marsh, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, S. Chandra, D. M. McGarrell, T. M. Schmidt, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31:442–443.
- Distel, D. L., and C. M. Cavanaugh. 1994. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *J. Bacteriol.* 176:1932–1938.
- Distel, D. L., H. K. W. Lee, and C. M. Cavanaugh. 1995. Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9598–9602.
- Felbeck, H., J. J. Childress, and G. N. Somero. 1981. Calvin-Benson cycle and sulfide oxidation enzymes in animals from sulfide-rich habitats. *Nature* 293:291.
- Felsenstein, J. 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), 3.6a3 ed. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fiala-Médioni, A., C. Métivier, A. Herry, and M. Le Pennec. 1986. Ultrastructure of the gill filament of an hydrothermal vent mytilid *Bathymodiolus* sp. *Mar. Biol.* 92:65–72.
- Fiala-Médioni, A., Z. P. McKiness, P. Dando, J. Boulegue, A. Mariotti, A. M. Alayse-Danet, J. J. Robinson, and C. M. Cavanaugh. 2002. Ultrastructural, biochemical and immunological characterisation of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Mar. Biol.* 141:1035–1043.

15. Fisher, C. R. 1990. Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev. Aquat. Sci.* 2:399–613.
16. Fisher, C. R., J. M. Brooks, J. S. Vodenichar, J. M. Zande, J. J. Childress, and R. A. Burke, Jr. 1993. The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *Mar. Ecol.* 14:277–289.
17. Fisher, C. R., J. J. Childress, R. S. Oremland, and R. R. Bidigare. 1987. The importance of methane and thiosulphate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Mar. Biol.* 96:59–71.
18. Fisher, C. R., J. J. Childress, A. J. Arrp, J. M. Brooks, D. L. Distel, J. A. Favuzzi, H. Felbeck, R. Hessler, K. S. Johnson, M. C. Kennicutt, S. A. Macko, A. Newton, M. A. Powell, G. N. Somero, and T. Soto. 1988. Microhabitat variation in the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*, at the Rose Garden vent on the Galapagos Rift. *Deep-Sea Res.* 35:1769–1791.
19. Fonselius, S. H. 1983. Determination of hydrogen sulfide, p. 73–80. In K. Grasshoff, M. Ehrhardt, and K. Kremling (ed.), *Methods of seawater analysis*, 2nd ed. Verlag Chemie, Kiel, Germany.
20. Fujiwara, Y., C. Kato, N. Masui, K. Fujikura, and S. Kojima. 2001. Dual symbiosis in the cold-seep thysanid clam *Maonithyas hadalis* from the hadal zone in the Japan Trench, western Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 214:151–159.
21. Fujiwara, Y., K. Takai, K. Uematsu, S. Tsuchida, J. C. Hunt, and J. Hashimoto. 2000. Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 208:147–155.
22. Hall, T. 1997–2001. BioEdit. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
23. Jobb, G. 2003. TREEFINDER, version March 2003. [Online.] G. Jobb, Munich, Germany. www.treefinder.de.
24. Levin, L. A., W. Ziebis, G. F. Mendoza, V. A. Growney, M. D. Tryon, K. M. Brown, C. Mahn, J. M. Gieskes, and A. E. Rathburn. 2003. Spatial heterogeneity of macrofauna at northern California methane seeps: influence of sulfide concentration and fluid flow. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 265:123–139.
25. Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettiske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K. H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363–1371.
26. Muzyer, G., A. Teske, C. O. Wirsen, and H. W. Jannash. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164:165–172.
27. Nishiguchi, M. K., E. G. Ruby, M. J. McFall-Ngai. 1998. Competitive dominance among strains of luminous bacteria provides an unusual form of evidence for parallel evolution in sepiolid squid-*Vibrio* symbioses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3209–3213.
28. Ondreas, H., K. Olu, Y. Fouquet, J. L. Charlou, A. Gay, B. Dennielou, J. P. Donval, A. Ffifs, T. Nadalig, P. Cochonot, E. Cauquil, and M. Sibuet. Integrated “in situ” study of a deep giant pockmark on the Gabon margin during the ZAIANGO and BIOZAIRE projects. Submitted for publication.
29. Page, H., A. Fiala-Médioni, C. Fisher, and J. Childress. 1991. Experimental evidence for filter-feeding by the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*. *Deep-Sea Res. Part I* 38:1455–1461.
30. Pimenov, N. V., M. G. Kalyuzhnaya, V. N. Khmelenina, L. L. Mityushina, and Y. A. Trotsenko. 2002. Utilization of methane and carbon dioxide by symbiotrophic bacteria in gills of Mytilidae (*Bathymodiolus*) from the Rainbow and Logatchev hydrothermal fields on the Mid-Atlantic Ridge. *Microbiology* 71:587–594.
31. Pond, D. W., M. V. Bell, D. R. Dixon, A. E. Fallick, M. Segonzac, and J. R. Sargent. 1998. Stable-carbon-isotope composition of fatty acids in hydrothermal vent mussels containing methanotrophic and thiotrophic bacterial endosymbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:370–375.
32. Qiu, X., L. Wu, H. Huang, P. McDonel, A. V. Palumbo, J. M. Tiedje, and J. Zhou. 2001. Evaluation of PCR-generated chimaeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:880–887.
33. Sarradin, P. M., and J. C. Caprais. 1996. Analysis of dissolved gases by headspace sampling gas chromatography with column and detector switching. Preliminary results. *Anal. Commun.* 33:371–373.
34. Sibuet, M., and K. Olu. 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep sea cold seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Res. Part II* 45:517–567.
35. Sibuet, M., and K. Olu-Le Roy. 2002. Cold seep communities on continental margins: structure and quantitative distribution relative to geological and fluid venting patterns, p. 235–251. In G. Wefter, D. Billeit, D. Hebbeln, B. B. Jørgensen, and T. J. Van Weering (ed.), *Ocean margin system*. Springer Verlag, Berlin Germany.
36. Sunamura, M., Y. Higashi, C. Miyako, J. Ishibashi, and A. Maruyama. 2004. Two *Bacteria* phylotypes are predominant in the Suiyo Seamount hydrothermal plume. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1190–1198.
37. Trask, J. L., and C. L. Van Dover. 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.
38. Tryon, M. D., K. M. Brown, and M. E. Torres. 2002. Fluid and chemical flux in and out of sediment hosting methane hydrate deposits on Hydrate Ridge, OR, II: hydrological processes. *Earth Planet. Sci. Lett.* 201:541–557.
39. Tunnicliffe, V., S. K. Juniper, and M. Sibuet. 2003. Reducing environments of the deep-sea floor, p. 81–110. In P. A. Tyler (ed.), *Ecosystems of the world: the deep-sea*. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.
40. Van Dover, C. L. 2000. *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
41. Von Cosel, R. 2002. A new species of bathymodioline mussel (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) from Mauritania (West Africa), with comments on the genus *Bathymodiolus* Kenk & Wilson, 1985. *Zoosystema* 24:259–271.
42. Wallner, G., R. Amann, and W. Beisker. 1993. Optimizing fluorescent *in situ*-hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14:136–143.
43. Won, Y. J., S. J. Hallam, D. O’Mullan, I. L. Pan, K. R. Buck, and R. C. Vrijenhoek. 2003. Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6785–6792.
44. Zhou, J., M. A. Bruns, and M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:316–322.

3.3 – Quelles informations peut on tirer de l'étude comparative de la diversité et du rôle nutritionnel des bactéries associées à Bathymodiolus heckerae, B. brooksii et B. childressii, trois mytilidés peuplant les sites de fluides froids du Golfe du Mexique ?

3.3.1 - Article 'Diversity, relative abundance and metabolic capabilities of bacterial endosymbionts in three Bathymodiolus mussels (Bivalvia : Mytilidae) from cold seeps in the Gulf of Mexico'

Duperron S., S. Wetzel, M. Sibuet, B. J. MacGregor, M. Kuypers, C. R. Fisher, N. Dubilier
A soumettre

La région du Golfe du Mexique abrite de nombreux sites de fluides froids situés à différentes profondeurs, plus ou moins riche en méthane d'origine thermo- et biogénique. Plusieurs espèces de mytilidés symbiotiques peuplent ces différents environnements. Pour cette étude, nous avons collecté trois espèces au cours de la campagne américaine Deep Seeps : *Bathymodiolus heckerae* sur le site de Florida Escarpment (3300 m), *B. brooksii* sur Alaminos Canyon (2220 m) et Atwater Canyon (1930 m), et enfin *B. childressii* collectée sur les mêmes agrégats que la précédente à Atwater Canyon. Les bactéries associées à chaque mytilidé ont été caractérisés à partir de leur ARNr 16S en vue de savoir quelles relations phylogénétiques les symbiontes de ces mytilidés géographiquement proches entretiennent entre eux, et avec les mytilidés d'autres régions. Le gène codant la sous unité A de la méthane mono oxygénase particulaire (*pmoA*) a également été séquencé afin de confirmer le potentiel à la méthanotrophie de la population de symbiontes. Les bactéries ont également été observées par FISH, et leur ARNr 16S quantifié par Slot Blot afin de décrire la distribution et de quantifier l'abondance relative des différentes symbiontes. Enfin, l'analyse de la composition isotopique en carbone des tissus animaux et de lipides caractéristiques des bactéries méthanotrophes ont complété cette approche en vue d'examiner le rôle nutritionnel des symbiontes.

B. childressii semble héberger seulement une bactérie méthanotrophe, tandis que *B. brooksii* abrite une double symbiose impliquant les mêmes bactéries sur les deux sites sur lesquels cette espèce a été collectée. Contrairement à ce qui a été observé pour les deux espèces de la ride médio Atlantique (voir III-3.1), les spécimens de *B. brooksii* et *B. childressii* d'Atwater Canyon ne présentent pas des symbiontes identiques. La troisième espèce, *B. heckerae*, abrite non pas deux mais quatre bactéries symbiotiques distinctes. Les deux dominantes sont une méthanotrophe et une sulfoxydante phylogénétiquement très

proches des symbiontes de la moule du Golfe du Guinée (voir III-3.2), dont certains taxonomistes pensent qu'elle pourrait appartenir à la même espèce (Von Cosel, comm. pers.). Les deux autres symbiontes de *B. heckerae* sont une bactérie sulfoxydante proche des symbiontes de moules hydrothermales, et une bactérie appartenant au groupe des CFB (*Cytophaga Flavobacterium Bacteroides*) dont la séquence est proche de séquences environnementales, et partage 90% de similarité avec celle de représentants du genre *Methylophaga*. Le rôle de ce dernier symbionte n'a pas été élucidé, même si l'on peut suggérer un métabolisme méthylotrophe et donc la capacité à utiliser le méthanol produit par les méthanotrophes, ou des composés monocarbonés du milieu. Le gène *pmoA* lié à la méthanotrophie a été identifié chez les trois espèces.

Toutes les bactéries symbiotiques identifiées ont été mises en évidence au niveau des branchies par FISH, et les bactéries méthanotrophes semblent dominer dans tous les cas. Une observation intéressante est que les specimens de *B. brooksii* collectés sur chacun des deux sites, Alaminos Canyon (2220 m) et Atwater Canyon (1930 m), affichent des abondances de symbiontes très différentes, ceux d'Atwater Canyon abritant beaucoup plus de bactéries dans leurs branchies. De même, les deux types de symbiontes sulfoxydants de *B. heckerae* ne cohabitent jamais au sein d'un même bactériocyte. Aucun signal FISH n'a pu être détecté au niveau des gonades.

L'hybridation d'ARN par slot blot est utilisée ici pour la première fois dans le cadre de l'étude des symbioses chimiosynthétiques en contexte d'environnements de fluides, pour quantifier l'abondance relative des différents symbiontes de *B. brooksii* et *B. heckerae*. Cette technique constitue un outil puissant et sensible pour la quantification et l'étude des variations d'abondances bactériennes dans le cadre d'études écologiques intégratives. Les quantifications effectuées ont confirmé la prédominance des bactéries méthanotrophes, déjà constatée par FISH. Elles ont également confirmé que les specimens de *B. brooksii* collectés sur Alaminos Canyon avaient des densités bactériennes plus élevées que ceux d'Atwater Canyon dans leurs branchies. Malheureusement, il n'a pas été possible d'effectuer des mesures chimiques au voisinage des individus collectés, si bien que ces variations ne peuvent être reliées à une quelconque hétérogénéité de l'environnement.

L'analyse de la composition isotopique du carbone des tissus et des lipides biomarqueurs confirme l'importance de la méthanotrophie dans la nutrition carbonée des hôtes, ainsi que l'importance des symbiontes dans la biosynthèse de lipides utilisés par les mytilidés comme le cholestérol. L'analyse de l'azote indique l'utilisation d'une source autochtone, probablement indépendante de l'activité photosynthétique de surface.

1 **Diversity, relative abundance, and metabolic capabilities of bacterial endosymbionts**
2 **in three species of *Bathymodiolus* mussels (Bivalvia: Mytilidae) from cold seeps in**
3 **the Gulf of Mexico**

4
5 Sébastien Duperron^{1,2}

6 Silke Wetzel¹

7 Myriam Sibuet²

8 Barbara J. MacGregor³

9 Marcel M.M. Kuypers¹

10 Chuck R. Fisher⁴

11 Nicole Dubilier^{1*}

12

13 Running title: Symbioses in three cold seep mussels

14 Journal section: Microbial Ecology

15

16 ¹Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen,
17 Germany

18 ²IFREMER Département Environnement Profond, Centre de Brest, B.P. 70, 29263
19 Plouzané, France

20 ³ Department of marine sciences, University of North Carolina, 17-8 Venable Hall,
21 CB#3300, Chapel Hill, N. C. 27599

22 ⁴ Pennsylvania State University, 208 Mueller Laboratory, University Park, P. A. 16802

23 *Corresponding author

24

24 Numerous cold seeps occur in the Gulf of Mexico. Resident faunas are dominated by
25 bacteria-associated invertebrates out of which mussels of the genus *Bathymodiolus*
26 constitute an important fraction. Three species were collected from sites in the northern
27 Gulf of Mexico: *B. heckerae* from the West Florida Escarpment, *B. brooksii* from
28 Atwater Canyon and Alaminos Canyon, and *B. childressii*, co-occurring with *B. brooksii*
29 in Alaminos Canyon. Analysis of bacterial 16S rRNA sequences indicate that *B. heckerae*
30 is associated with four endosymbionts: a methanotroph, two distinct thiotrophs, and a
31 member of a clade not previously known to include symbionts. The two dominant
32 symbionts resemble those of *Bathymodiolus* sp., a mussel from Gabon Margin cold seeps.
33 *B. brooksii* harbors a dual symbiosis with a methanotrophic and a thiotrophic bacteria,
34 and *B. childressii* is only associated with methanotrophs. The sequencing of *pmoA*, a
35 gene encoding a subunit of particulate methane monooxygenase, confirms the
36 methanotrophic potential of symbionts. Stable isotope analyses on lipid and whole tissue
37 emphasize the importance of methanotrophy in the carbon nutrition of mussels. The
38 examination of symbiont distribution using fluorescence in situ hybridization (FISH) in
39 *B. heckerae* and *B. brooksii* indicate that methanotrophs dominate and that the two types
40 of thiotrophs identified in *B. heckerae* do not co-occur within a given bacteriocyte.
41 Quantification of the relative amount of each symbiont's rRNA by slot blot hybridization
42 confirms the dominance of methanotrophs in both mussel species, but also indicates that
43 specimens of *B. brooksii* from Alaminos Canyon harbor far less bacteria than those from
44 Atwater Canyon within their gills.

45

46

46 **Introduction**

47

48 Deep sea mussels of the genus *Bathymodiolus* are part of the dominant
49 macrofauna occurring in many chemosynthesis-based ecosystems, including cold seeps
50 and hydrothermal vents worldwide due to their successful association with
51 chemosynthetic bacteria, (56, 62). The bacteria occur in specialized cells of the gill
52 epithelium, the bacteriocytes (21). Some species of *Bathymodiolus* such as *B.*
53 *thermophilus* have thiotroph (sulfide-oxidizing, CO₂-fixing) symbionts (12), while others
54 such as *B. childressi* contain methanotrophs (methane-oxidizing) (14). Five species are
55 known to harbor dual symbioses, with both types of bacteria: *B. puteoserpentis* and *B.*
56 *azoricus* from Mid Atlantic Ridge vent sites, *B. heckerae* and *B. brooksii* from cold seeps
57 in the Gulf of Mexico (GOM), and an undescribed *Bathymodiolus* from a cold seep on
58 the Gabon Margin (8, 15, 18, 20, 23).

59 Numerous hydrocarbon cold seeps occur in the northern GOM, on the Louisiana
60 continental slope (52) as well as on the western Florida Escarpment (61). Methane of
61 thermogenic and biogenic origin occurs in form of gas hydrates that are consumed by
62 bacteria (39). Dominant metazoans include mussels, tubeworms, polychaetes, nematodes,
63 and foraminifera (51, 56). Several species of mussels are found at these sites, mainly
64 *Bathymodiolus heckerae* on the West Florida Escarpment, and *Bathymodiolus brooksii*
65 and *Bathymodiolus childressi* on the Louisiana Slope, the latest being common at shallow
66 sites (29). TEM studies and enzyme assays indicated that *B. heckerae* and *B. brooksii* are
67 dual symbiotic species (8, 23), their carbon nutrition depending mostly on methane
68 according to the $\delta^{13}\text{C}$ values measured in mussel tissue. Methanotrophs were shown to be

69 the dominant symbionts in *B. heckeriae* based on TEM counts (53). *B. childressi* has
70 methanotrophic symbionts based on TEM observation of large bacteria with stacked
71 internal membranes, methanol deshydrogenase activity, and 16S ribosomal RNA (rRNA)
72 sequence analysis (14, 22, 25). This species also derives most of its carbon nutrition from
73 methane (22, 24), and at least part of its nitrogen nutrition from photosynthetically
74 derived organic matter at shallowest sites (48). Transplantation experiments confirms that
75 a methane-rich environment accelerates carbon turn over and growth in *B. childressii* (3,
76 10).

77 To date, the phylogeny of the bacterial symbionts has only been described in *B.*
78 *childressi*, and it is not known how the symbionts of other GOM mussel species are
79 related to each other and those from other seep and vent sites. In this study, we examined
80 the phylogeny and relative distribution of symbionts in *B. heckeriae*, *B. brooksii*, and *B.*
81 *childressii* from 3 sites in the GOM using comparative 16S rRNA sequence analysis and
82 fluorescence in situ hybridization (FISH). To examine the effect of absolute and relative
83 symbiont abundance on stable carbon isotope signatures, we used the same individuals
84 for 16S rRNA slot blot hybridization and stable isotope analyses of whole gill tissues and
85 lipids. Finally, we further assessed the metabolic capabilities of the symbionts by
86 examining the gene coding for the A subunit of particulate methane monooxygenase
87 (pMMO).

88

88 **Materials and methods**

89

90 *Sampling and storage*

91 Samples were collected in October 2003 during the Deep Seeps cruise 11 Leg I in the
92 Gulf of Mexico, using the manned submersible Alvin (chief scientists: C. R. Fisher and
93 B. Carney). *Bathymodiolus heckerae* specimens were collected on the West Florida
94 Escarpment (WF) (26°02.00'N 84°55.03'W, 3284 m) during dives 3915 and 3916.
95 *Bathymodiolus brooksii* specimens were collected at Atwater Canyon (AT) (27°34.1N,
96 88°29.8W, 1893 m) during dive 3918, and Alaminos Canyon (AL) (26°21.32'N
97 94°30.12'W, 2226 m) during dives 3922,3923, and 3924. *Bathymodiolus childressii*
98 specimens co-occurred with *B. brooksii* at Alaminos Canyon and were collected during
99 dive 3924.

100 Mussels were dissected immediately after recovery. In each specimen, the anterior part
101 of the left gill was immediately processed for RNA extraction (see below), another part,
102 located in the median zone, was frozen for DNA studies, stable isotope and lipid
103 analyses (see below), and several parts of the gill (anterior, median, posterior), as well as
104 a portion of gonads were fixed for FISH (see below). The foot was frozen for stable
105 isotope analysis.

106

107 *16S rRNA sequencing and phylogeny of symbionts*

108 Total DNA was extracted from frozen gill tissues of three *B. heckerae*, three *B.*
109 *brooksii* (one from AT and two from AL), and two *B. childressii* individuals. The 16S
110 rRNA gene was amplified using the procedures and cycling conditions described in (18),

111 running 4 parallel PCR reactions per DNA sample with 25 PCR cycles. Parallel PCR
112 reactions were pooled, purified (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Germany), and
113 ligated into a plasmid (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Germany). After
114 transformation of competent *E. coli* cells, clones were grown overnight, and their insert
115 size checked. Partial sequencing with the GM1F primer was performed on positive clones
116 after plasmid extraction (QIAprep Miniprep Kit, Qiagen). Partial sequences were aligned
117 with Bioedit (30), chimeras were identified with the Bellerophon program (33), and
118 representative clones from each phylotype were fully sequenced (Tab. 1). Sequencing
119 reactions were run on an ABIPRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,
120 CA).

121 Sequence alignment and preliminary phylogenetic analyses were performed using
122 ARB (41) and Treefinder (37). After selection of a proper dataset, alignments were
123 exported, manually truncated to remove ambiguously aligned positions (retained
124 alignment included 1224 positions), and phylogenetic analyses were performed using Mr.
125 Bayes (34). Parameters included a GTR model, a Gamma distributed model of site
126 substitution probabilities (4 categories), and 4 parallel Monte Carlo Markov Chains, and
127 the analyses were run over 400,000 generations. Support values displayed at nodes
128 represent the percentage of trees displaying this node among the 3500 most probable
129 trees.

130

131 *Fluorescence in situ hybridization (FISH)*

132 FISH was performed on transversal sections of gill tissues from eight mussels: four *B.*
133 *brooksii* (two from AT and two from AL) and four *B. heckerae* specimens. Parts of each

134 gill (anterior, median and posterior), as well as gonad tissue, were fixed in 2%
135 formaldehyde in 1X phosphate-buffered saline (PBS: 10 mM sodium phosphate, 130 mM
136 NaCl) (4°C, 2-4 h), rinsed 3 times in 1X PBS, and stored at -80°C in 0.5X PBS: 50%
137 EtOH (1:1). Tissues were embedded in polyester wax (polyethylene glycol distearate:
138 hexadecanol-1 (9:1)) and 4-7 µm thick sections were cut with a RM 2165 microtome
139 (Leica, Germany) and collected on Superfrost® Plus slides (Roth, Germany). Wax was
140 removed in a decreasing ethanol series, and sections were hybridized as described in (18),
141 under conditions determined to be stringent for the probes used (Table 2). After washing,
142 sections were stained with DAPI, mounted with an anti-bleaching agent (Citifluor, UK)
143 and examined under a LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Germany).

144 A total of five probes were newly designed with the PROBE_DESIGN function in
145 ARB to target the symbionts in *B. brooksii* and *B. heckeriae* (FISH analyses of the
146 symbionts in *B. childressi* are described in (14)). The specificity of each symbiont probe
147 was tested by FISH against all the other symbionts in the appropriate mussel species, and
148 no cross-hybridization occurred, indicating that each probe was specific for one of the
149 detected symbiont types in a given species. Probe Bmeth-1291 targets methanotroph-
150 related symbionts in both mussel species, and probe Bthio-193 targets the thiotrophic
151 symbiont of *B. brooksii* and the non-dominant thiotrophic symbiont T2 in *B. heckeriae*.
152 (Tab. 2).

153

154 *RNA extraction and slot blot hybridization*

155 Immediately after sample recovery, total RNA was extracted from the most anterior
156 portion of the left gill of eleven *B. heckeriae* and seven *B. brooksii* specimens (200-400

157 mg tissue). Dissected gill tissue was immediately placed in RNAwiz (Ambion, UK) and
158 homogenized. After 5 min incubation at room temperature (RT), 0.2 vol chloroform was
159 added, and the mixture incubated at RT for 10 min. Tubes were then centrifuged (15 min,
160 10000 g, 4°C), and the aqueous phase transferred to a new tube, to which 1 vol
161 isopropanol was added. After incubation (10 min, RT), samples were centrifuged as just
162 described. Pellets were air dried, and stored at -80°C. In the home laboratory, RNA
163 integrity was checked on a polyacrylamide gel.

164 RNA mussel samples were blotted in triplicates of 50 µl each. On the same
165 membrane, dilution series of a positive control of known RNA concentration was
166 blotted, and samples and controls hybridized with ³³P-labeled probes as described in (57).
167 The 3 bacterial reference strains were used as controls to determine the temperature
168 required for probe specificity (see below). RNA extracted from *E. coli* was used as
169 control for determining concentrations of bacterial RNA. Membranes were washed at the
170 temperature determined to be specific (Table 2), air-dried, and the intensity of the
171 hybridization signal measured with a Typhoon 9400 Phospho-Imager (Amersham, UK).

172 The same probes were used as for FISH, except that the methanotrophic probes were
173 replaced by a single probe targeting methanotroph rRNA in both species (Bmeth-1291),
174 to prevent any bias due to a possible difference in probe efficiencies . Probe specificity
175 was determined using transcribed rRNA from a plasmid containing the 16S rRNA insert
176 targeted by the probe as a 0 bp mismatch control, and compared with a bacterial reference
177 strain with mismatches to the probe (*Xenorhabdus bovienii* for Bthio-193 and Bmeth-
178 1291 (2 and 4 mismatches), *Wautersia eutropha* for BhecM2-822 (4 mismatches) and
179 *Methylosphaera glauca* for BhecT1-193 (2 mismatches)). Transcribed rRNA from clones

180 was also used to produce the dilutions series used for quantifying the RNA targeted by
181 specific probes.

182

183 *Sequencing and phylogeny of particulate methane monooxygenase subunit A*

184 The gene coding for particulate methane monooxygenase subunit A (*pmoA*) was
185 amplified from the DNA extracted from a single individual of each mussel species using
186 the primers A189F and MB661R (32) with the following cycling conditions: 92°C (4
187 min), 33 cycles with 92°C (1 min), 55°C (1.5 min) and 72°C (1 min), then a final
188 elongation step at 72°C (10 min). PCR products were purified, cloned, and sequenced
189 following the same protocol described for 16S rRNA genes.

190 Amino acid sequences of *pmoA* were aligned with ARB, and phylogenetic
191 reconstruction was performed with the PROML program from PHYLIP (19) using a JTT
192 model of amino acid substitution. Bootstrap values were obtained from 200 replicates
193 analysed with PROTDIST and the same substitution model.

194

195 *Stable isotope analysis of whole tissue and lipids*

196 Gill and foot tissue of thirteen specimens of *B. heckeriae*, eleven specimens of *B.*
197 *brooksii* (six from AT and five from AL), including specimens used for slot blot, and six
198 specimens of *B. childressii* were incubated overnight in 0.1N HCl, dehydrated in a 60°C
199 chamber for 24 hours, and ground. Carbon and nitrogen isotopic composition was then
200 analyzed using a mass spectrometer.

201 Lipids were extracted from the gill tissue of three specimens of *B. heckeriae*, five
202 specimens of *B. brooksii* (three from AT, two from AL), and three specimens of *B.*

203 *childressii*. Extractions were also performed from foot tissue of two specimens of *B.*
204 *heckerae*, three specimens of *B. brooksii* (two from AT, one from AL), and one specimen
205 of *B. childressii*. The freeze-dried tissue was subsequently extracted with two times 10ml
206 methanol, 10ml methanol: dichloromethane 1:1 and two times 10ml dichloromethane
207 using an ultrasonic-bath (with ice-water) to obtain the total lipid extracts. Aliquots of the
208 total extracts were saponified after addition of an internal standard (containing 1-
209 nonadecanol, nonadecanoic acid, 5 α -cholestane and hexatriacontane) with aqueous 0.5 N
210 KOH in methanol (3h at 80 °C). Nonsaponifiable (neutral lipids) and acid fractions were
211 sequentially extracted with hexane at pH = 14 and pH = 2, respectively.

212 The neutral fractions were silylated with N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
213 (BSTFA) in pyridine and the acid fractions were methylated with BF₃/methanol and
214 analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for identification and
215 quantification of the fatty acids and steroids. Repeated concentration measurements were
216 within $\pm 10\%$. GC-isotope ratio monitoring MS (irmMS) was performed as described
217 previously (54).

218

218 **Results**

219

220 *Symbiont diversity and phylogeny*

221 The 16S rRNA gene sequences from gill tissues of *B. childressii* belonged to a single
222 phylotype, those of *B. brooksii* to 2, and those of *B. heckerae* to 4 distinct phylotypes
223 (Tab. 1). Sequence variation between clones within each phylotype was very low (0-
224 0.2%). Phylogenetic trees based on likelihood methods and various datasets displayed a
225 similar topology to the Bayesian tree shown in Fig. 1. All phylotypes belong to the γ -
226 Proteobacteria, and, with one exception, cluster in 1 of 2 monophyletic clades: either in a
227 group of *Bathymodiolus*-associated methanotrophic symbionts, or in a large clade with
228 thiotrophic symbionts of bivalves (families Mytilidae, Vesicomidae and Thyasiridae).

229 The single bacterial phylotype found in *B. childressii* is almost identical to the one
230 described by Distel *et al.* as belonging to the methanotrophic symbiont of *B. childressii*
231 from the coast off Louisiana (99.6% identical positions) (11). Of the 8 differences
232 observed, 5 are unique to the *B. childressii* sequence from Distel *et al.*, the rest of
233 methanotrophic symbionts not being variable at these positions. Of the two phylotypes
234 identified in *B. brooksii*, one is highly similar to the *B. thermophilus* thiotrophic symbiont
235 (99.4% identical positions) (12). Of the 9 differences, 5 are unique to *B. thermophilus*, the
236 rest of the thiotrophs being constant at these positions, and 3 differences are nucleotide
237 substitutions also observed in other sequences of thiotrophic symbionts. The second
238 phylotype shares only 97.6% identity with its closest relative, the *B. puteoserpentis* /
239 *azoricus* methanotroph (15). A total of four symbiont phylotypes were recovered from *B.*
240 *heckerae* clone libraries. The most abundant one was highly similar (99.3%) to the

241 methanotroph phylotype from the Gabon margin mussel, *Bathymodiolus* sp. (18), with
242 which it formed a monophyletic group (support value: 100). The second and third
243 phylotype, *B. heckerae* symbionts T1 and T2, shared 96.5% identity with each other and
244 were related to thiotrophic symbionts from other bivalve species. As with the
245 methanotroph, the closest relative of the T1 phylotype is the thiotrophic symbiont of the
246 Gabon margin *Bathymodiolus* (99.2% identity). Together with clone SUP05-21, an
247 environmental sequence from Suiyo Seamount (59), these three sequences form a
248 monophyletic group (support value: 100). The third phylotype, *B. heckerae* symbiont T2,
249 is similar to the thiotrophic symbiont of *B. septemdiarium* from vents near Japan (98.6%
250 identical positions) (28), but does not fall in a monophyletic group with any other
251 sequence. The fourth phylotype, *B. heckerae* symbiont M2, does not cluster with any
252 known symbionts from chemosynthetic hosts. Its closest relative is clone B47
253 (AY375075) (support value: 100), an environmental sequence from deep-sea sediments
254 of the Western Pacific 'Warm Pool' (95% identity) (64). This group shares a sister
255 relationship with *Methylophaga* species, a group of free-living methylotrophic bacteria
256 (support value: 100).

257

258 *FISH*

259 In both *B. brooksii* and *B. heckerae*, all probes hybridized specifically to their target
260 bacteria confirming that the 16S rRNA sequences shown in Fig. 1 originated from
261 bacterial symbionts. All symbionts were located in the apical part of the gill
262 bacteriocytes, and no bacteria were observed in gonad tissues.

263 Two morphologically distinct bacteria co-occurred in the gill filaments of *B. brooksii*
264 (Fig. 2A,B). The bacteria that hybridized to the probe specific to the methanotroph
265 related 16S rRNA sequence were larger than those targeted by the probe specific to the
266 thiotroph related sequence, and occurred more basally within the host cells. In mussels
267 from both AT and AL, the methanotrophs were more abundant than the thiotrophs, with
268 the latter particularly rare in mussels from AT (Fig. 2A). The overall abundance of
269 symbionts appeared much higher in mussels from AT than those from AL (Fig. 2A,B).

270 As in *B. brooksii*, methanotrophs were the dominant symbionts in the gill tissues of *B.*
271 *heckerae*. They were larger than the three other *B. heckerae* symbionts, and occurred
272 more basally within the bacteriocytes (Fig. 2C-D). Of the two thiotrophic symbionts, T1
273 was more abundant than T2, which was found in only two of the four specimens
274 investigated (Fig. 2E,F). In individuals where both T1 and T2 were present, they
275 generally did not co-occur within a single bacteriocyte. Instead, they often occupied
276 opposite sides of a gill filament (Fig. 2E-F). The fourth symbiont, which is related to
277 methylotrophs, was found in the most apical parts of some bacteriocytes in all specimens
278 investigated, and displayed a characteristic elongated rod-shaped morphology (Fig. 2D).

279 Control hybridizations comparing all symbiont probes versus the general bacterial
280 probe Eub338, did not show any bacteria that hybridized with the Eub338 probe that were
281 not detected with the specific probes targeting symbionts, indicating that the symbiotic
282 bacteria of both species were successfully identified.

283

284 *Relative abundance of symbiont rRNA as determined by slot blot Hybridization*

285 *In B. brooksii* from AT, bacterial rRNA accounted for $39.0 \pm 20.3\%$ of total rRNA
286 while in specimens from AL bacterial rRNA was only $5.1 \pm 2.4\%$ of the total (see Tab. 3).
287 Of the 2 bacterial symbionts that co-occur in *B. brooksii*, rRNA from the methanotroph
288 dominated over rRNA from the thiotroph, making up $86.2 \pm 6.2\%$ of total bacterial rRNA
289 in AT specimens and $78.2 \pm 21.0\%$ in the AL mussels. Thiotrophic rRNA contents were
290 much lower in the AT mussels ($0.7 \pm 0.1\%$ of bacterial rRNA) than in the AL mussels
291 ($9.1 \pm 3.2\%$).

292 In *B. heckeriae* (WF), bacterial rRNA contents were comparable to those found in *B.*
293 *brooksii* from AT and accounted for $32.8 \pm 7.5\%$ of total rRNA. As in *B. brooksii*,
294 methanotrophic rRNA was dominant, representing $79.5 \pm 13.3\%$ of the bacterial fraction.
295 The second highest fraction of symbiont rRNA came from the methylotroph-related
296 symbiont M2, whose rRNA made up $8.3 \pm 3.1\%$ of total bacterial rRNA. Of the 2
297 thiotrophic symbionts, relative rRNA contents of the T1 symbiont were much higher at
298 $5.2 \pm 3.9\%$ of bacterial rRNA than those of the T2 symbionts, which were only $0.3 \pm 0.4\%$
299 and were at or below detection limits in half of the individuals.

300

301 *Particulate methane monooxygenase*

302 Partial sequences (~155 amino acids) of the gene coding for particulate methane
303 monooxygenase subunit A (*pmoA*) were obtained from *B. brooksii*, *B. heckeriae* and *B.*
304 *childressii* (Tab. 1). As expected for hosts with only one methanotrophic symbiont, a
305 single *pmoA* sequence was recovered from *B. brooksii* and *B. heckeriae*. The former
306 shared 95.6% amino acid sequence identity with the sequence from *B. azoricus*
307 (Spiridonova, unpublished), and the later shared 91.6% identity with an unpublished

308 *pmoA* sequence from an unnamed *Bathymodiolus* vent mussel (AB062137). In *B.*
309 *childressi*, which also hosts only a single methanotrophic symbiont, two *pmoA* sequences
310 with only 81.0% identity to each other were identified. One is highly similar (99.5%) to
311 the *B. heckerae* sequence, while the second one shares 91.7% identity with a *pmoA*
312 sequence, PMO-J (AY354048) from the hydrothermal vent Rainbow on the Mid-Atlantic
313 Ridge (46). Maximum likelihood analyses show that all mussel sequences cluster within
314 the γ Proteobacteria *pmoA* genes (Fig. 3). Sequences from *Bathymodiolus* mussels form a
315 weakly supported monophyletic group (bootstrap value 40) except for the second *pmoA*
316 sequence of *B. childressi* that falls outside of this group.

317

318 *Stable isotope analysis of whole tissue*

319 Both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the foot tissue were less negative than the $\delta^{13}\text{C}$ and
320 $\delta^{15}\text{N}$ values of gill tissue, although the differences are in most cases not statistically
321 significant (Tab. 4). The most negative mean $\delta^{13}\text{C}$ value was measured for specimens of
322 *Bathymodiolus heckerae* from WF (-77.1 ‰). In *B. brooksii*, specimens collected from
323 AT display a more negative stable carbon isotope signature (-60.8 ‰) than specimens
324 from AL (-46.0 ‰). The $\delta^{13}\text{C}$ values measured from gill tissue of *B. brooksii* and *B.*
325 *childressi* are similar, -46.0 ‰ and -49.0 ‰, respectively. The mean $\delta^{15}\text{N}$ values of the
326 investigated mussel tissue are negative in all species and sites. They range from -7.9 ‰
327 in *B. heckerae* to -0.3 ‰ in *B. childressii* with *B. brooksii* displaying intermediate $\delta^{15}\text{N}$
328 values, slightly more negative for specimens from AT (-4.7 ‰) than for specimens from
329 AL (-3.5 ‰). In specimens of *B. heckerae*, and *B. brooksii* from AL, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$
330 values are positively correlated for both gill and foot tissue (Fig 4). Neither *B. brooksii*

331 from AT nor *B. childressi* from AL displayed such a correlation. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of
332 *B. brooksii* from AL increase together at approximately the same relative rates as in *B.*
333 *heckerae*. In *B. childressi*, the correlation can be seen if an outlier (M38) is removed; if it
334 is, carbon values change more quickly than nitrogen values compared to the other
335 samples. All mussels investigated were adults with shell lengths above 58 mm. Stable
336 isotope signatures of carbon and nitrogen did not correlate with any of the size
337 parameters.

338

339 ***Lipid analysis***

340 In the three species, the neutral fraction of lipids were strongly dominated by
341 steroids, almost exclusively 4-Me-cholestadienol (*B. heckerae* and *B. brooksii*) and
342 cholesterol (*B. childressii*). For a given specimen, $\delta^{13}\text{C}$ values of steroids were more
343 negative than values measured on whole gill tissue by 8.6 to 18.9 ‰ (Tab. 4). Analysis of
344 FAMES (Fatty Acids Methyl Esters) in gill tissue yielded predominantly C16:1 and
345 C18:1 fatty acids, while foot tissue contained in comparison more C20:1 and C22:2 fatty
346 acids. Precise quantification was not performed, nor did we assess for the position of
347 double bounds. Determination of the $\delta^{13}\text{C}$ values of the FAMES yielded markedly
348 negative values for all specimens (Tab. 4). For a given specimen, values measured from
349 the C16 to C22 fatty acids were similar, difference between the lowest and highest value
350 ranging from 2.7 to 11.0 ‰ (mean value: 6.5 ‰). Mean values measured from FAMES
351 from a given specimen are also similar, thus slightly more negative, compared to values
352 measured from whole tissue, the difference ranging from -0.6.to -6.7 ‰ (mean value: -
353 3.8 ‰).

354

354 **Discussion**

355

356 *Diversity and biogeography of Gulf of Mexico mussels symbioses*

357 Three mussel species, and as many types of symbiotic associations, are investigated
358 in this study. As described previously (11), *B. childressii* is shown to be associated with
359 methanotrophic bacteria (11). For *B. brooksii*, the hypothesis of a dual symbiosis with
360 methanotrophic and thiotrophic bacteria, based on TEM observations and stable isotope
361 signatures (23), is confirmed by the phylogenetic identification and *in situ* observation of
362 symbionts. The unexpected result concerns *B. heckerae*, which was assumed to harbor a
363 dual symbiosis based on TEM observations (8, 53), and found here to be associated with
364 four different bacteria: a methanotroph related and two thiotroph related symbionts, and a
365 bacterium related to environmental sequences distantly related to *Methylophaga*. This
366 fourth bacterium does not belong to any known group of symbionts, and thus no
367 inference can be made about its function. This is the first report of a *Bathymodiolus*
368 mussel harboring more than two types of symbiotic bacteria. A similar increase in
369 symbiont diversity when applying molecular methods was previously observed in
370 oligocahete worms, pointing out the necessity for looking at a large number of clones,
371 (16).

372 Neither the methanotroph-related nor the thiotroph-related symbionts from the
373 three Gulf of Mexico mussel species form a monophyletic group, indicating that the
374 biogeography of the hosts may not play an important role in determining the phylogenetic
375 relationships of the symbionts. The methanotroph related symbionts of *B. childressii* and
376 *B. brooksii*, the two mussel species co-occurring at AL, are not most closely related to

377 each other, indicating that each species has a specific relationship to its own particular
378 symbiont. Instead, the *B. heckerae* methanotrophic and dominant chemoautotrophic T1
379 symbiont sequences are almost identical to those from symbionts of *Bathymodiolus* sp.
380 from the Gabon Margin (18), despite the large geographic distance between these two
381 sites. This result corroborates preliminary morphological observations suggesting that the
382 Gabon margin mussel is the same as *B. heckerae* (Von Cosel, pers. comm.). However,
383 caution is needed when using 16S rRNA as an evolutionary marker, as its phylogenetic
384 resolution is not accurate enough to investigate relationships between very closely related
385 bacteria (1). In particular, a recent study using the Internal Transcribed Spacer region
386 (ITS) has shown that the thiotrophic symbionts of *B. azoricus* and *B. puteoserpentis*
387 belonged to distinct bacterial strains, although their 16S rRNA sequences were identical
388 (63).

389 The mode of transmission of symbionts between mussels is still unclear.
390 Environmental transmission was suggested for thiotrophic symbionts of vent mussels
391 from the Mid-Atlantic Ridge (63), which is supported by our observation that no
392 symbionts were detected by FISH in gonadal tissue of the three species investigated.
393 However, a formal proof is still lacking to conclude definitely about the mode of
394 transmission of symbionts.

395

396 *Dominance of methanotrophs and methanotrophy*

397 The recovery of *pmoA* sequences in all three mussel species confirmed the
398 methanotrophic potential of the symbionts. Proof that these genes are expressed by the

399 symbionts, however, will require a method such as mRNA-FISH, which was recently
400 developed to demonstrate *pmoA* expression in the vent mussel *B. azoricus* (47).

401 The existence of at least two distinct *pmoA* sequences in *B. childressii* suggests that
402 we either did not detect all types of methanotrophic symbionts with our method, or, more
403 probably according to their great divergence (81% identity in amino acid sequence), that
404 two distinct operons exist in the same methanotrophic symbiont. In type I methanotrophs,
405 the existence of two *pmo* operons was shown in *Methylococcus capsulatus* and
406 *Methylomicrobium album*, but the copies were nearly identical (0.5% variation in the
407 nucleic acid sequence) (55, 58). The occurrence of two very different copies of *pmoA*
408 (68.5% identity in amino acid sequence), none of which is related to the second *pmoA*
409 sequence of *B. childressii*, has been reported in the Type II methanotroph *Methylocystis*
410 strain SC2 but is not previously reported from Type I methanotrophs (50).

411 Lipids extracted from the neutral fraction include 4-Me-cholestadienol, a steroid
412 characteristic for some aerobic methane oxidizers (35). Its negative $\delta^{13}\text{C}$ signature
413 supports a methanotrophic origin. The C16:1 and, to a lesser extent, C18:1 FAMES are
414 considered diagnostic for methanotrophic bacteria. They were found to be dominant in
415 gill tissue, while foot tissue contained more C₂₀ and C₂₂ fatty acids, which are
416 characteristic of marine mussels (35). Together with the markedly negative $\delta^{13}\text{C}$
417 signature, these lipids are indicative of the presence and importance of methanotrophs in
418 the gills. The phylogenetic relationships, the presence of *pmoA* sequences, the presence of
419 characteristic lipids and their negative $\delta^{13}\text{C}$ signature, and the morphology of symbionts
420 previously published for mussels from the Gulf of Mexico (8, 23, 25) are convincing
421 evidence that the methanotroph-related symbionts are actually methanotrophic bacteria.

422 These methanotrophs dominated over other bacterial symbionts in the gills of all
423 individuals of the two species tested, as evidenced by FISH, and slot blot hybridization of
424 symbiont rRNA. Such a dominance of methanotrophs among symbionts was also
425 reported in a *Bathymodiolus* species from a Gabon margin cold seep site. In that case,
426 methane concentrations were much higher than sulfide concentrations (18).

427 To our knowledge, this study is the first to use slot blot hybridization for the
428 quantification of bacterial symbionts associated with invertebrates from chemosynthesis
429 based environments. In a case like symbiosis where bacteria are tightly packed together,
430 slot blot probably gives a more reliable estimate of relative abundances than visual
431 examination using TEM or FISH. Despite the fact that slot blot does not directly quantify
432 cell numbers, we suggest that values measured are good representatives of symbionts as a
433 carbon source, and are a good index of the importance of symbionts as seen from the
434 hosts side (57). The abundance of methanotrophs and the $\delta^{13}\text{C}$ signatures displayed by
435 their specific lipids (4-Me-cholestadienol and 16:1 and 18:1 FAMES), as well as gill
436 tissue, indicate that they are the main contributors to the hosts carbon uptake. This is
437 confirmed by the markedly negative $\delta^{13}\text{C}$ values displayed by the symbiont-free foot
438 tissue in the three species, indicating carbon transfer from the gill. The $\delta^{13}\text{C}$ values we
439 measured for *B. heckerae* are very similar to those reported previously for this species (7,
440 8, 35), and to $\delta^{13}\text{C}$ values of methane at the Florida Escarpment, which range from -61 to
441 -93.8 ‰ (6, 31, 61). $\delta^{13}\text{C}$ values of specimens of *B. brooksii* from AT are also
442 comparable to $\delta^{13}\text{C}$ values of thermogenic methane at this site (-49.3 ‰)(39). No data is
443 available for methane at AL, but $\delta^{13}\text{C}$ values of *B. brooksii* and *B. childressii* are similar
444 to values published elsewhere for *B. childressii* (10, 35, 42-44).

445

446 *Minor symbionts in B. heckerae*

447 In *B. heckerae*, the existence of two thiotroph-related symbionts belonging to the
448 clade of thiotrophic symbionts of *Bathymodiolus* makes any conclusions about the
449 biogeography or the existence of co-speciation processes difficult because other
450 *Bathymodiolus* species may also house more than one thiotroph. This points out the need
451 for the sequencing of large clone libraries, and using FISH to confirm the origin of
452 recovered sequences. The two thiotroph related symbionts are not equally abundant: the
453 one identified as dominant by FISH and slot blot was detected in all individuals, whereas
454 the other one was only observed in 2 out of 4 individuals. This second thiotroph related
455 symbiont might be an example of a facultative symbiosis, in which case it would raise
456 questions about the transmission of such a type of symbiont. It is interesting that the two
457 thiotrophs seemed to exclude each other from bacteriocytes. This could result from
458 competition between bacteria, or from separate infections of empty bacteriocytes (if
459 environmental transmission occurs). The tendency for the same thiotroph to occupy
460 several adjacent bacteriocytes may be the result of bacteriocyte division, or of lateral
461 spread of bacteria into pre-existing host cells. The role of the second thiotroph is unclear.
462 Its phylogenetic position argues for a thioautotrophic metabolism, in which case there
463 would be functional redundancy between the two symbionts. The fact that these two
464 bacteria rarely co-occur within a bacteriocyte could indicate that either T1 or T2 is
465 sufficient for the proper functioning of symbiosis in *B. heckerae*. The occurrence of
466 several proteobacterial symbionts has been reported in the thyasirid bivalve *Maorithyas*
467 *hadalis* (27) and in the oligochaete *Olavius crassitunicatus* (4), but the symbionts were

468 less closely related to each other, and thus more likely to play distinct roles. Four closely
469 related gamma proteobacterial symbionts were identified and distinguished with FISH in
470 the wood-boring bivalve *Lyrodus pedicellatus*, but their respective roles in the nutrition
471 of their host could not be assessed (13).

472 The fourth symbiont of *B. heckerae*, phylotype M2, is rather abundant according
473 to slot blot hybridization, and was found in all individuals examined. Its evolutionary
474 relationship to free-living *Methylophaga* suggests that it may be a methylotrophic
475 bacterium. Methylotrophs such as *M. marina* and *M. thalassica* assimilate C1 compounds
476 through the ribulose monophosphate pathway (2, 36). The T2 symbiont occurred in the
477 apical part of the bacteriocytes, in close association with the methanotrophs, indicating
478 that it might be using C1 compounds, such as methanol, which might be produced by
479 methanotrophs. Alternatively, methanol could be coming from the surrounding water.
480 Based on the recovery of only one *pmoA* sequence in *B. heckerae*, and on the fact that all
481 known methanotrophs belonging to the γ -Proteobacteria form a monophyletic group well
482 separated from *Methylophaga*, this symbiont seems unlikely to be a methanotroph.

483

484 *Inter-site variability in bacterial abundances in B. brooksii*

485 In *B. brooksii*, the proportion of bacterial relative to host rRNA was much higher in
486 specimens from AT than in those from AL, based on slot blot hybridization and FISH
487 observations. Mussel specimens from both sites were similar in size and in gill
488 appearance, showing no evidence for starvation subsequent to a dramatic change of
489 conditions at AL, a phenomenon known to lead to the decrease of bacterial abundances in
490 symbiotic mussels (49). Furthermore, specimens from AT displayed more negative $\delta^{13}\text{C}$

491 values than specimens from AL. This result might reflect the greater importance of
492 methanotrophy in the nutrition of mussels from AT, which would be consistent with the
493 higher abundance of symbiotic bacteria in specimens from this site, and would indicate
494 that this difference is stable over time. Alternatively, the difference could be due to
495 differences in $\delta^{13}\text{C}$ values of methane at the two sites. Methane was shown to be
496 thermogenic at AT, with a $\delta^{13}\text{C}$ value of -49.3‰ (39). Unfortunately, no data is available
497 on the $\delta^{13}\text{C}$ value of methane at AL. It is interesting that $\delta^{13}\text{C}$ values measured from
498 specific methanotroph lipids such as 4-Me cholestadienol steroids and C16:1 and C18:1
499 fatty acids are different between AT and AL, reflecting the differences observed for
500 mussel whole tissue. This would tend to indicate that either methane has a different
501 signature at the two sites, or that methane plays a greater role in the nutrition of
502 'methanotrophs' in AT mussels, while AL mussels symbionts fix more carbon from other
503 sources such as organic compounds for example. Combination of differences in relative
504 importance of methanotrophy to the mussels nutrition and differences in the stable
505 isotopic composition of methane between AT and AL is also possible.

506 The relative abundance of thiotroph versus total symbionts was approximately 10-
507 fold lower in AT specimens than in specimens from AL, and much lower than the total
508 abundance of the T1 and T2 thiotroph symbionts of *B. heckerae*. This difference in
509 abundance could originate from differences in sulfide concentrations between the sites.
510 Indeed, previous studies have shown that the relative abundance of methanotrophs versus
511 thiotrophs can vary between sites (20, 60), and is probably influenced by the chemical
512 characteristics of the surrounding water (18)(17).

513 Unfortunately, no *in situ* chemical data is available, but the difference in bacterial
514 abundance might correspond to a different nutritional response on the two sites, maybe
515 linked to differences in fluid chemistry. This would confirm that the host is able to
516 control symbiont populations as a long term strategy for coping with the environment, not
517 only in symbiont relative abundances as previously demonstrated (17, 60), but also with
518 regard to overall symbiont abundance.

519

520 *Nitrogen assimilation*

521 No reliable data about the stable N isotopic composition of the source nitrogen is
522 available for any of the sites considered in this study. The only data published is a value
523 of 7.5 ± 0.8 ‰ reported for particulate organic matter in the Gulf of Mexico (26, 45).
524 Nitrate and ammonia in deep water sediment usually have $\delta^{15}\text{N}$ values ranging from 3 to
525 8 ‰ (9), while N_2 can have a more negative $\delta^{15}\text{N}$ value in thermogenic hydrocarbon
526 seeps (-4 ‰) (5). Values measured in *B. heckeriae*, *B. childressii* and *B. brooksii* are
527 negative, and as $\delta^{15}\text{N}$ values usually increase by approximately 3 ‰ per trophic level, it
528 is very unlikely that these mussels derive their nitrogen diet predominantly from organic
529 matter of photosynthetic origin. The positive correlation between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ observed
530 in gill and foot tissue from *B. heckeriae* from Florida Escarpment and *B. brooksii* from
531 Alaminos Canyon suggests coupled dynamics for carbon and nitrogen uptake, or a unique
532 source of carbon and nitrogen such as the fluids. Although the lack of such a relationship
533 in *B. brooksii* from Atwater Canyon and *B. childressii* does not support this view, it is
534 often proposed that symbiont-associated mussels assimilate nitrogen from local sources,
535 either as ammonium, or, to a lesser extent, as nitrate(10, 21, 38). Indeed, ammonium and

536 nitrate concentrations up to 13 and 41 μM respectively were measured over *B. heckeriae*
537 beds (40). The depletion in ^{15}N would then be due to high ammonium concentrations at
538 the sediment water interface, leading to preferential incorporation of $^{14}\text{NH}_3$ over $^{15}\text{NH}_3$
539 (40, 43). However, specimens of *B. childressii* from shallow sites (600 m depth) were
540 also shown to be able to obtain part of their nitrogen from photosynthetically-derived
541 compounds (48). A contribution of N_2 to the nitrogen supply was shown to be unlikely
542 (40).

543 The difference between $\delta^{15}\text{N}$ values measured in co-occurring specimens of *B.*
544 *brooksii* and *B. childressii* is an interesting observation. These two species co-occur
545 within mussel beds, likely experiencing similar environmental conditions although they
546 are associated with distinct methanotrophs. In that context specimens of *B. childressii*,
547 displaying less negative signatures, seem to either display a different fractionation against
548 ^{15}N , or use a distinct strategy regarding nitrogen assimilation.

549

550

551 Acknowledgments

552 We thank the captain and crew of the Atlantis II and DSV Alvin for their precious
553 help during the Deep Seeps 11 cruise (Chief scientists: B. Carney and C. Fisher) and Gabi
554 Klockgether for analytical support. S.D. is a student of the International Max Planck
555 Research School of Marine Microbiology PhD program and his grant is co-funded by
556 Ifremer and the Max Planck Institute for Marine Microbiology. This work was supported
557 by the Max Planck Society and Ifremer.

1. **Acinas, A. G., V. Klepac-Ceraj, D. E. Hunt, C. Pharino, I. Ceraj, D. L. Distel, and M. F. Polz.** 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* **430**:551-554.
2. **Anthony, C.** 1982. *The biochemistry of methylootrophs*, London.
3. **Bergquist, D. C., C. Fleckenstein, E. B. Szalai, J. Knisel, and C. R. Fisher.** 2004. Environment drives physiological variability in the cold seep mussel *Bathymodiolus childressi*. *Limnol. Oceanogr.* **49**:706-715.
4. **Blazejak, A., C. Erseus, R. Amann, and N. Dubilier.** 2005. Coexistence of Bacterial Sulfide Oxidizers, Sulfate Reducers, and Spirochetes in a Gutless Worm (Oligochaeta) from the Peru Margin. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1553-1561.
5. **Brooks, J. M., M. C. Kennicutt, C. R. Fisher, and e. al.** 1987. Deep sea hydrocarbon seep communities: evidence for energy and nutritional carbon sources. *Science* **238**:1138-1142.
6. **Carney, R. S.** 1994. Consideration of the oasis analogy for chemosynthetic communities at Gulf of Mexico hydrocarbon vents. *Geo-Marine Letters* **14**:149-159.
7. **Cavanaugh, C. M.** 1993. Methanotroph-invertebrate associations: symbioses from deep sea cold seeps and hydrothermal vents, p. 227-230. *In* R. Guerrero and C. Pedros-Alio (ed.), *Trends in Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology.
8. **Cavanaugh, C. M., P. R. Levering, J. S. Maki, R. Mitchell, and M. E. Lidstrom.** 1987. Symbiosis of methylootrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* **325**:346-347.
9. **Conway, N. M., M. C. Kennicutt, and C. L. Van Dover.** 1994. Stable isotopes in the study of marine chemosynthetic-based ecosystems, p. 158-186. *In* K. Lajtha and R. H. Michener (ed.), *Stable isotopes in ecology and environmental sciences*. Blackwell, Oxford.

10. **Dattagupta, S., D. C. Bergquist, E. B. Szalai, S. A. Macko, and C. R. Fisher.** 2004. Tissue carbon, nitrogen and sulfur stable isotope turnover in transplanted *Bathymodiolus childressii* mussels: relation to growth and physiological condition. *Limnol. Oceanogr.* **49**:1144-1151.
11. **Distel, D., H. Felbeck, and C. Cavanaugh.** 1994. Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbionts and their bivalve host. *Journal of Molecular Evolution* **38**:533-542.
12. **Distel, D., D. Lane, G. Olsen, S. Giovannoni, B. Pace, N. Pace, D. Stahl, and H. Felbeck.** 1988. Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts - Analysis of phylogeny and specificity by 16S ribosomal RNA sequences. *Journal of Bacteriology* **170**:2506 - 2510.
13. **Distel, D. L., D. J. Beaudoin, and W. Morrill.** 2002. Coexistence of multiple proteobacterial endosymbionts in the gills of the wood-boring bivalve *Lyrodus pedicellatus* (Bivalvia: Teredinidae). *Appl. and Env. Microbiol.*:6292 - 6299.
14. **Distel, D. L., and C. M. Cavanaugh.** 1994. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *Journal of Bacteriology* **176**:1932-1938.
15. **Distel, D. L., H. K. W. Lee, and C. M. Cavanaugh.** 1995. Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:9598-9602.
16. **Dubilier, N., C. Mülders, T. Felderman, D. De Beer, A. Pernthaler, and M. Klein.** 2001. Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing in an oligochaete worm. *Nature* **411**:298-302.
17. **Duperron, S., C. Bergin, F. Zielinski, Z. P. McKiness, E. G. DeChaine, C. M. Cavanaugh, and N. Dubilier.** in prep. A dual symbiosis shared by two mussel

- species, *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge.
18. **Duperron, S., T. Nadalig, J. C. Caprais, M. Sibuet, A. Fiala-Médioni, R. Amann, and N. Dubilier.** 2005. Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (South East Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in the gills. *Appl. Env. Microbiol.* **71**:1694-1700.
 19. **Felsenstein, J.** 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), 3.6a3 ed. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
 20. **Fiala-Médioni, A., Z. P. McKiness, P. Dando, J. Boulegue, A. Mariotti, A. M. Alayse-Danet, J. J. Robinson, and C. M. Cavanaugh.** 2002. Ultrastructural, biochemical and immunological characterisation of two populations of the Mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Marine Biology* **141**:1035-1043.
 21. **Fisher, C. R.** 1990. Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Reviews in Aquatic Sciences* **2**:399-613.
 22. **Fisher, C. R. (ed.).** 1993. Oxidation of methane by deep-sea Mytilids in the Gulf of Mexico. Chapman & Hall.
 23. **Fisher, C. R., J. M. Brooks, J. S. Vodenichar, J. M. Zande, J. J. Childress, and R. A. Burke Jr.** 1993. The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *P. S. Z. N. I: Marine Ecology*.
 24. **Fisher, C. R., and J. J. Childress.** 1992. Organic carbon transfer from methanotrophic symbionts to the host hydrocarbon-seep mussel. *Symbiosis* **12**:221-235.

25. **Fisher, C. R., J. J. Childress, R. S. Oremland, and R. R. Bidigare.** 1987. The importance of methane and thiosulphate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Marine Biology* **96**:59-71.
26. **Fry, B.** 1983. Fish and shrimp migrations in the Northern Gulf of Mexico analyzed using stable C, N and S isotope ratios. *Fish. Biol.* **81**:789-801.
27. **Fujiwara, Y., C. Kato, N. Masui, K. Fujikura, and S. Kojima.** 2001. Dual symbiosis in the cold-seep thyasirid clam *Maorithyas hadalis* from the hadal zone in the Japan Trench, western Pacific. *Marine Ecology Progress Series* **214**:151-159.
28. **Fujiwara, Y., K. Takai, K. Uematsu, S. Tsuchida, J. C. Hunt, and J. Hashimoto.** 2000. Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distribution. *Marine Ecology Progress Series* **208**:147-155.
29. **Gustafson, R., R. Turner, R. Lutz, and R. Vrijenhoek.** 1998. A new genus and five new species of mussels (Bivalvia, Mytilidae) from deep-sea sulfide/hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico. *Malacologia* **40**:63-112.
30. **Hall, T.** 1997-2001. BioEdit.
31. **Hecker, B.** 1985. Fauna from a cold sulfur-seep in the Gulf of Mexico: comparison with hydrothermal vent communities and evolutionary implications. *Biol. Bull. Soc. Wash.* **6**:465-474.
32. **Holmes, A. J., A. Costello, M. E. Lidstrom, and J. C. Murrell.** 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia may be related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:203-208.
33. **Huber, T., G. Faulkner, and P. Hugenholtz.** 2004. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**:2317-2319.

34. **Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**:754-755.
35. **Jahnke, L. L., R. E. Summons, L. M. Dowling, and K. D. Zahiralis.** 1995. Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold seep mussel gills: chemical and isotopic analysis. *Appl. Env. Microbiol.*:576 - 582.
36. **Janvier, M., and P. Grimont.** 1995. The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch Gamma of Proteobacteria. *Res. Microbiol.* **146**:543-550.
37. **Jobb, G.** 2003. TREEFINDER version March 2003. Munich, Germany. Distributed by the author at www.treefinder.de.
38. **Kennicutt, M. C., R. A. Burke, I. MacDonald, J. M. Brooks, G. J. Denoux, and S. A. Macko.** 1992. Stable isotope partitioning in seep and vent organisms: chemical and ecological significance. *Chemical Geology* **101**:293-310.
39. **Lanoil, B. D., R. Sassen, M. T. La Duc, S. T. Sweet, and K. H. Nealson.** 2001. *Bacteria and Archaea* physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Appl. Env. Microbiol.* **67**:5143-5153.
40. **Lee, R. W., and J. J. Childress.** 1994. Assimilation of inorganic nitrogen by marine invertebrates and their chemoautotrophic symbionts. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:1852-1858.
41. **Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Konig, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K. H. Schleifer.** 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**:1363-1371.

42. **MacAvoy, S. E., R. Carney, C. R. Fisher, and S. A. Macko.** 2002. Use of chemosynthetic biomass by large, mobile, benthic predators in the Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **225**:65-78.
43. **MacAvoy, S. E., S. A. Macko, and R. Carney.** 2003. Links between chemosynthetic production and mobile predators on the Louisiana continental Slope: stable carbon isotopes of specific fatty acids. *Chemical Geology* **201**:229-237.
44. **MacAvoy, S. E., S. A. Macko, and S. B. Joye.** 2002. Fatty acid carbon isotope signatures in chemosynthetic mussels and tubeworms from Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities. *Chemical Geology* **185**:1-8.
45. **Macko, S. A., L. Entzeroth, and P. L. Parker.** 1984. Regional differences in nitrogen and carbon isotopes on the continental shelf of the Gulf of Mexico. *Naturwissenschaften* **71**:374-375.
46. **Nercessian, O., N. Bienvenu, D. Moreira, D. Prieur, and C. Jeanthon.** 2005. Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environ. Microbiol.* **7**:118-132.
47. **Pernthaler, A., and R. Amann.** 2004. Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* **70**:5426-5433.
48. **Pile, A. J., and C. M. Young.** 1999. Plankton availability and retention efficiencies of cold-seep symbiotic mussels. *Limnol. Oceanogr.* **44**:1833-1839.
49. **Raulfs, E. C., S. A. Macko, and C. L. Van Dover.** 2004. Tissue and symbiont condition of mussels (*Bathymodiolus thermophilus*) exposed to varying levels of hydrothermal activity. *J. Mar. Biol. Ass. UK* **84**:229-234.

50. **Ricke, P., C. Erkel, M. Kube, R. Reinhardt, and W. Liesack.** 2004. Comparative analysis of the conventional and novel *pmo* (Particulate Methane Monooxygenase) operons from *Methylocystis* strain SC2. *Appl. Env. Microbiol.* **70**:3055-3063.
51. **Robinson, C. A., J. M. Bernhard, L. A. Levin, G. F. Mendoza, and J. K. Blanks.** 2004. Surficial hydrocarbon seep infauna from the Blake Ridge (Atlantic Ocean, 2150 m) and the Gulf of Mexico (690-2240 m). *Mar. Ecol.* **25**:313-336.
52. **Sager, W. W., I. MacDonald, and R. Hou.** 2003. Geophysical signatures of mud mounds at hydrocarbon seeps on the Louisiana continental slope, northern Gulf of Mexico. *Mar. Geol.* **198**:97-132.
53. **Salerno, J. L., S. A. Macko, S. J. Hallam, M. Bright, Y. Won, Z. P. McKiness, and C. L. Van Dover.** 2005. Characterization of symbiont populations in life-history stages of mussels from chemosynthetic environments. *Biol. Bull.* **208**:145-155.
54. **Schouten, S., W. C. M. Klein-Breteler, P. Blokker, N. Schogt, K. Grice, W. I. C. Rijpstra, M. Baas, and J. S. Sinninghe Damsté.** 1998. Biosynthetic effects on the stable isotopic composition of algal lipids: implications for deciphering the carbon biomarker record. *Geochim. Cosmochim. Acta* **62**:1397-1406.
55. **Semrau, J. D., C. J., J. Lebron, A. Costello, J. Davagnino, E. Kenna, A. J. Holmes, R. Finch, J. C. Murrell, and M. E. Lidstrom.** 1995. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *J. Bacteriol.* **177**:3071-3079.
56. **Sibuet, M., and K. Olu.** 1998. Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep sea cold seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Research II* **45**:517 - 567.
57. **Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield, and L. Montgomery.** 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Env. Microbiol.* **54**:1079-1085.

58. **Stolyar, S., A. Costello, T. L. Peeples, and M. E. Lidstrom.** 1999. Role of multiple gene copies in particulate methane monooxygenase activity in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath. *Microbiology* **145**:1235-1244.
59. **Sunamura, M., Y. Higashi, C. Miyako, J. Ishibashi, and A. Maruyama.** 2004. Two *Bacteria* phlotypes are predominant in the Suiyo Seamount hydrothermal plume. *Appl. Env. Microbiol.* **70**:1190-1198.
60. **Trask, J. L., and C. L. Van Dover.** 1999. Site-specific and ontogenetic variations in nutrition of mussels (*Bathymodiolus* sp.) from the Lucky Strike hydrothermal vent field, Mid-Atlantic Ridge. *Limnology and Oceanography* **44**:334-343.
61. **Turnispeed, M., C. D. Jenkins, and C. L. Van Dover.** 2004. Community structure in Florida Escarpment seep and Snake Pit (Mid-Atlantic Ridge) vent mussel beds. *Mar. Biol.*
62. **Van Dover, C. L.** 2000. *The ecology of deep-sea hydrothermal vents.* Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
63. **Won, Y. J., S. J. Hallam, D. O'Mullan, I. L. Pan, K. R. Buck, and R. C. Vrijenhoek.** 2003. Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Appl. Env. Microbiol.* **69**:6785-6792.
64. **Zeng, R., J. Zhao, R. Zhang, and N. Lin.** 2005. Bacterial community in sediment from the western Pacific Warm Pool. *China Environ. Sci.* **282-290**.

Tab. 1: clone table displaying the number of partial (number) and full (number in parenthesis) 16S rRNA sequences obtained from each individual and type of symbiont. T1 and T2 = thiotroph-related symbionts, M1 = methanotroph-related symbionts, M2 = methylotroph-related symbionts. The number of *pmoA* clones sequenced is displayed in the last column.

Species	# specimen	T1	T2	M1	M2	Total 16S	PmoA
<i>B. heckeriae</i>	1 (M3)	2 (0)	11 (2)	20 (2)	-	33 (4)	
	2 (M6)	3 (2)	-	31 (2)	-	34 (4)	95 (1)
	3 (M12)	-	-	39 (2)	3 (1)	42 (3)	
<i>B. brooksii</i>	1 (M24)	8 (2)	-	25 (4)	-	33 (6)	
	2 (M29)	20 (2)	-	6 (1)	-	26 (3)	31 (16)
	3 (M30)	23 (2)	-	13 (1)	-	36 (3)	
<i>B. childressii</i>	1 (M34)	-	-	33 (2)	-	33 (2)	82 (64)
	2 (M36)	-	-	17 (1)	-	17 (1)	-

Tab. 2: Oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Sequence (5'-3')	Position ^a	Specificity ^b	For (%) ^c	T (°C) ^d
Bthio-193	CGAAGATCCTCCACTTTA	193	<i>B. brooksii</i> T1 <i>B. heckeriae</i> T2	20	48
BhecT1-193	AAGAGGGCTCCTTTT	193	<i>B. heckeriae</i> T1	10	44
BhecM2-822	CTCCCACACACTTAGTTG	822	<i>B. heckeriae</i> M2	20	46
BbroM1-574	AAACCACCTACGAACGC	574	<i>B. brooksii</i> M1	20	-
BangM-138 (Duperron et al., 2005)	ACCAGGTTGTCCCCCACTAA	138	<i>B. heckeriae</i> M1	20	-
Bmeth-1291	GCAATCCGGACTAAGATCG	1291	<i>B. brooksii</i> M1 <i>B. heckeriae</i> M1	-	44

^aPosition in the 16S rRNA of *Escherichia coli*

^b T1 and T2 = thiotroph-related symbionts, M1 = methanotroph-related symbionts, M2 = methylotroph-related symbionts

^cFormamide concentration in FISH hybridization buffer in vol/vol

^dTemperatures used for washing in slot blot hybridization

Tab. 3: Relative abundance of symbiont rRNA in *B. heckeræ* and *B. brooksii* based on slot blot hybridization. Symbiont rRNA (sym) as targeted by specific probes (Tab.2) for the methanotroph-related (M1), methylotroph-related (M2), and thiotroph-related (T1 and T2) symbionts is given as a percentage of either total rRNA (rRNA_{Uni} as targeted by the Uni1390 probe) or bacterial rRNA (rRNA_{Eub} as targeted by the Eub338 probe). WF = West Florida Escarpment, AT = Atwater Canyon, and AL = Alaminos Canyon.

Species	Specimen	sym/rRNA _{Uni}	M1/rRNA _{Eub}	T1/rRNA _{Eub}	T2/rRNA _{Eub}	M2/rRNA _{Eub}	sym/rRNA _{Eub}
<i>B. heckeræ</i> (WF)	M1	34.3	80.9	5.2	0.8	9.1	96.0
	M2	29.2	80.4	3.6	0.7	7.2	91.8
	M3	35.2	78.7	3.6	0.8	6.7	89.8
	M4	41.2	51.1	5.8	0.1	3.6	60.6
	M6	49.0	71.5	16.4	0.6	9.0	97.5
	M8	33.5	97.6	6.3	0.2	12.5	116.6
	M9	34.6	67.6	2.0	0.0	4.2	73.9
	M10	22.9	82.4	4.4	0.1	9.3	96.1
	M11	25.0	81.0	3.6	0.0	9.6	94.2
	M12	28.2	84.5	2.3	0.0	6.2	92.9
	M13	28.1	98.9	4.1	0.2	13.5	116.8
<i>B. brooksii</i> (AT)	M20	53.4	90.6	0.7	-	-	91.3
	M23	24.7	81.9	0.6	-	-	82.5
<i>B. brooksii</i> (AL)	M26	5.4	86.8	5.5	-	-	92.4
	M27	8.6	50.4	7.2	-	-	57.6
	M28	4.1	82.9	8.9	-	-	91.8
	M29	1.9	105.8	10.3	-	-	116.1
	M30	5.6	65.7	13.8	-	-	79.5

Species	Specimen	Whole tissue				Neutral lipids $\delta^{13}\text{C}$ steroids	Fatty acids $\delta^{13}\text{C}$						
		$\delta^{13}\text{C}$ gill	$\delta^{13}\text{C}$ foot	$\delta^{15}\text{N}$ gill	$\delta^{15}\text{N}$ foot		C16:1	C16:0	C18:3	C18:1	C18:0	C20:1	C22:2
<i>B. heckeriae</i> (WF)	M1	-78.2	-74.5	-8.7	-8.1								
	M2	-76.3	-73.3	-7.6	-6.4		-77.6	-74.4	-81.1	-79.1	-74.3	-81.0	-80.6
	M3	-74.6	-72.6	-7.7	-6.3								
	M4	-79.0	-73.1	-9.6	-7.8								
	M5	-77.0	-73.1	-8.4	-7.1								
	M6	-73.4	-70.7	-6.1	-5.1								
	M7	-77.0	-73.5	-6.4	-5.0		-77.3	-72.6	-77.1	-73.5	-70.0	-78.8	-74.8
	M8	-76.9	-73.5	-7.5	-6.0								
	M9	-75.0	-73.1	-5.6	-5.6	-83.6	-79.2	-79.7	-79.0	-76.5	-69.8	-76.3	-78.3
	M10	-83.0	-81.2	-12.9	-12.4	-95.7	-83.1	-87.4	-88.9	-84.1	-79.1	-87.2	-88.0
	M11	-80.4	-76.9	-9.9	-8.5	-91.3	-81.9	-76.8	-85.1	-83.0		-81.4	-84.5
	M12	-74.6	-72.5	-5.1	-3.6								
	M13	-76.8	-73.4	-7.6	-5.1								
<i>B. brooksii</i> (AT)	M20	-53.7	-51.8	-4.6	-4.5	-62.2	-53.4	-54.3	-54.4	-56.8	-52.3	-51.3	-57.8
							-55.5	-57.0	-59.0	-56.6	-58.7	-59.8	-63.2
	M21	-58.2	-59.7	-5.0	-3.4	-72.2	-62.6	-66.5	-62.1	-63.8	-62.4	-61.7	-67.4
	M22	-59.0	-61.2	-7.0	-4.6	-77.5	-66.4	-67.1	-64.7	-65.3	-65.2	-63.4	
	M23	-67.3	-61.0	-3.3	-3.9								
	M24	-66.4	-64.4	-4.3	-4.0		-66.1	-65.8	-65.5	-66.5	-65.3	-66.9	-68.6
<i>B. brooksii</i> (AL)	M25	-60.1	-59.1	-4.0	-3.4								
	M26	-47.0	-45.4	-4.9	-4.5								
	M27	-45.8	-44.8	-3.3	-3.3	-60.9	-46.4	-46.4	-51.4		-48.1	-49.5	-51.1
	M28	-44.7	-44.4	-3.3	-3.1	-60.5	-49.1	-46.5	-50.0	-51.5	-48.9	-48.1	-52.0
							-50.0	-47.4	-49.9	-51.7	-48.7	-47.8	-47.9
	M29	-44.8	-44.4	-1.9	-2.8	-63.7							
<i>B. childressii</i> (AL)	M30	-47.5	-45.8	-4.2	-3.6								
	M33	-58.6	-53.2	-0.1	-0.8								
	M34	-53.9	-50.2	-0.6	-0.1								
	M35						-51.3	-49.7	-51.2	-52.0	-47.6	-50.9	-51.2
	M36	-52.2	-50.6	0.6	0.9	-63.8	-55.1	-55.1	-55.3	-54.1	-50.6	-54.0	-53.8
	M37	-42.9	-43.3	0.9	1.3	-50.3	-44.9	-46.4	-46.6	-46.6	-45.1	-44.0	-45.1
M38	-38.3	-37.0	-3.3	-3.3	-46.1	-42.4	-39.0	-43.7	-43.1	-41.5	-42.2	-50.0	

Tab. 4: Isotopic composition of whole tissue, steroids and specific fatty acids from *B. heckerae*, *B. brooksii* and *B. childressii*. All values are given in per mil (‰). In the $\delta^{13}\text{C}$ steroids (‰), steroid measured were 4me cholestadienol for *B. heckerae* and *B. brooksii* and cholesterol *B. childressii*. For fatty acids, values obtained from gill tissue are displayed in normal characters, values obtained from foot tissue are in italics. WF = West Florida Escarpment, AT = Atwater Canyon, and AL = Alaminos Canyon.

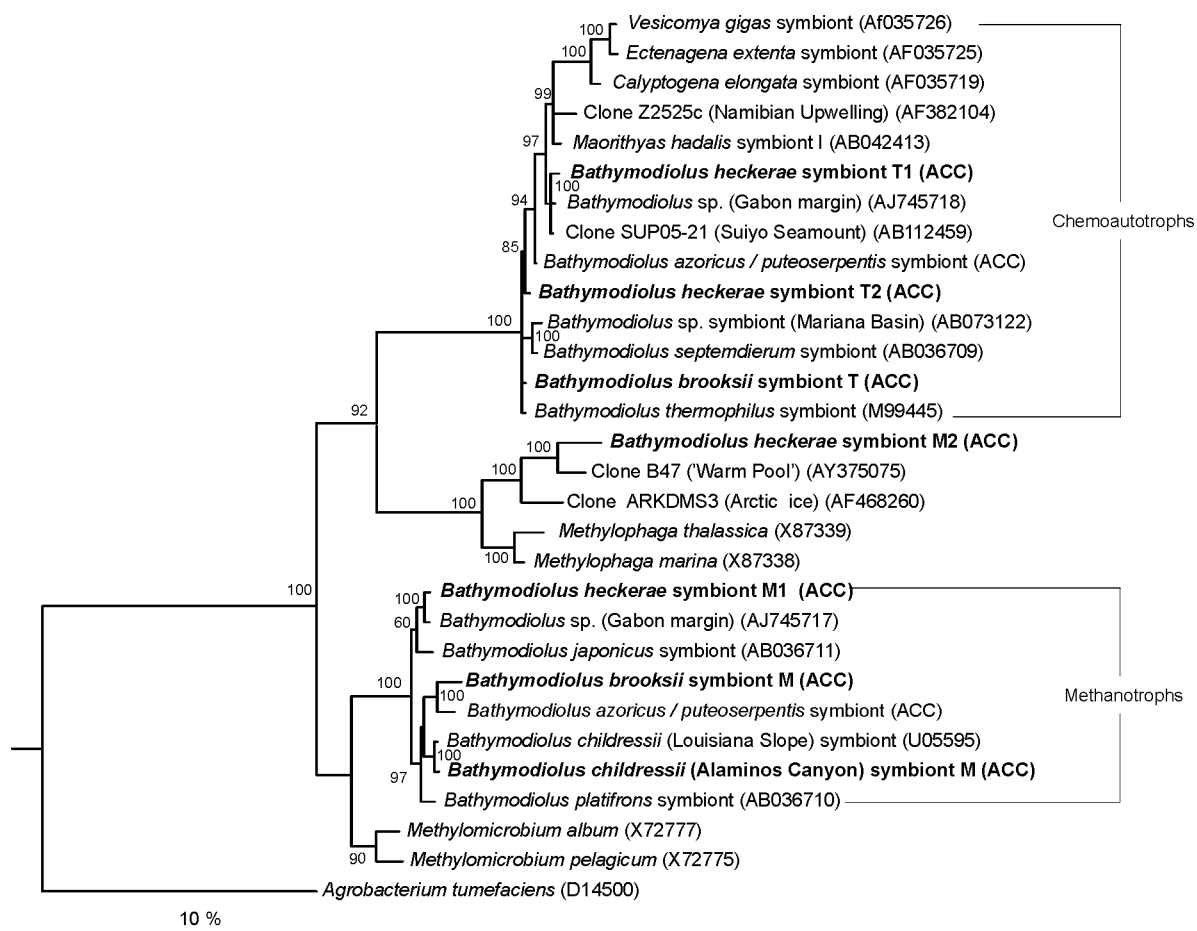


Fig. 1: Phylogeny of γ -proteobacterial endosymbionts of *Bathymodiolus* mussels based on 16S rRNA sequences using Bayesian inference. In brackets are the two groups known to include mussel-associated bacteria prior to this study, and in bold the sequences from this study. Consensus was established over the 3,500 most probable trees. Scores displayed at nodes represent, among these trees, the percentage displaying the given partition (only values above 60% are shown). Scale bar = 10 % estimated base substitution.

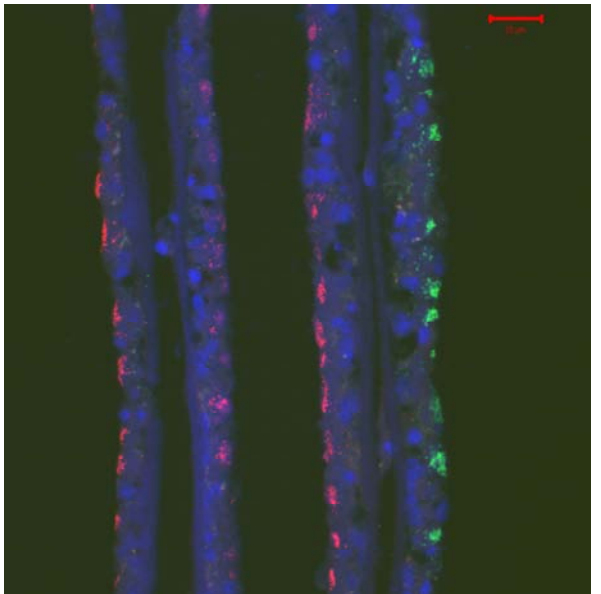
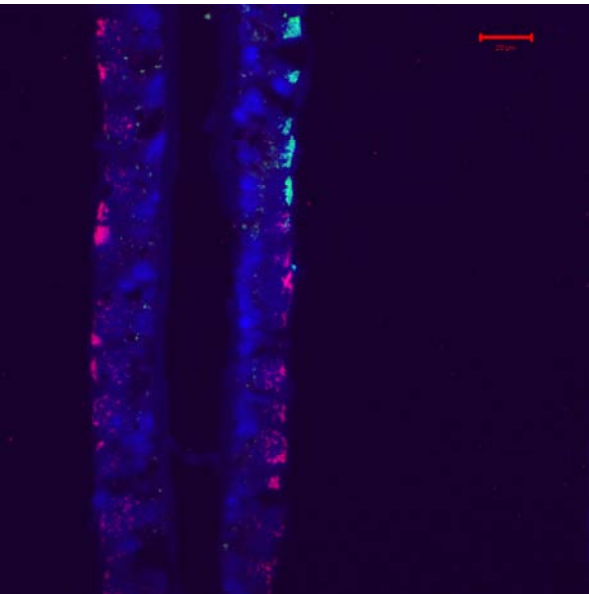
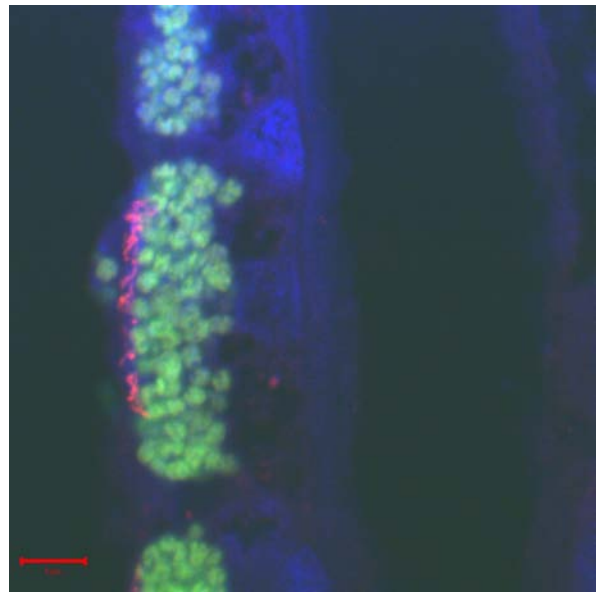
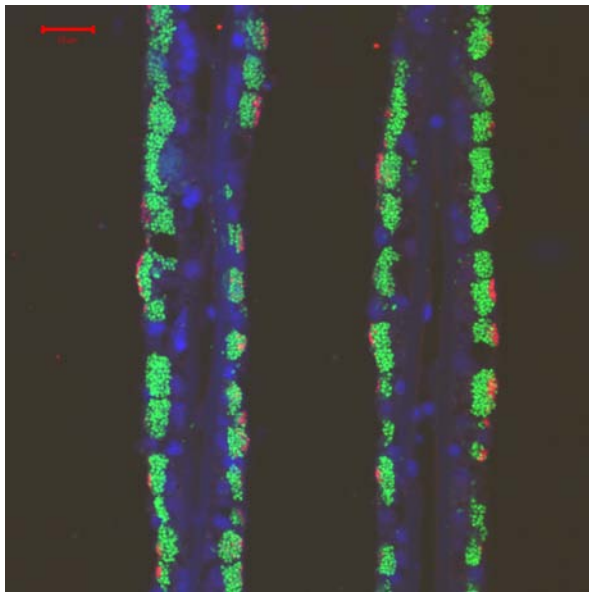
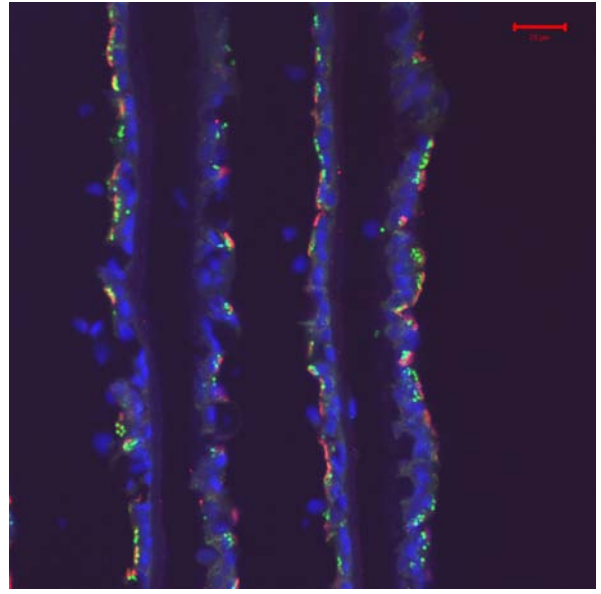
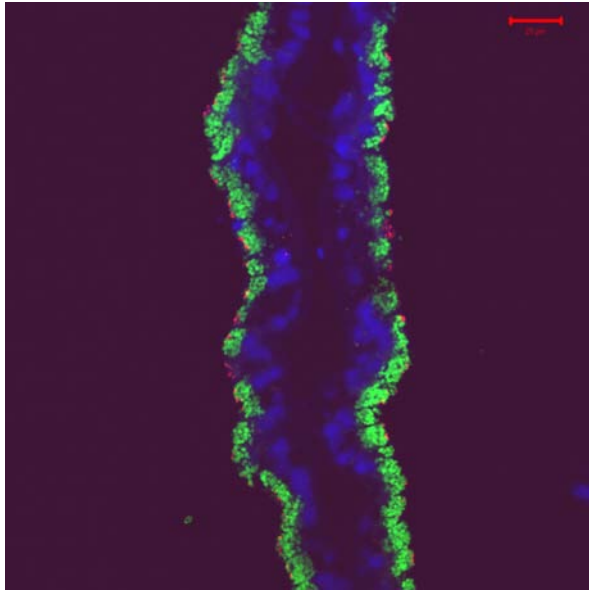


Fig. 2 A-F: Fluorescence *in situ* identification of symbiotic bacteria in mussel gill filaments. **A-B:** Methanotroph-related (green) and thiotroph-related (red) symbionts in *B. brooksii* from Atwater Canyon (A) and Alaminos Canyon (B). Scale bar = 20 μm . **C-F:** Symbionts in *B. heckeræ* from the West Florida Escarpment. **C:** Methanotroph- and methylotroph-related symbionts (M1 and M2 in green) co-occur with thiotroph-related symbionts (T1 and T2 in red). Scale bar = 20 μm . **D:** Methanotroph- (M1 in green) and methylotroph-related (M2 in red) symbionts. Scale bar = 5 μm . **E-F:** Thiotroph-related symbiont T1 (red) and T2 (green) **E:** scale bar = 10 μm , **F:** scale bar = 20 μm .

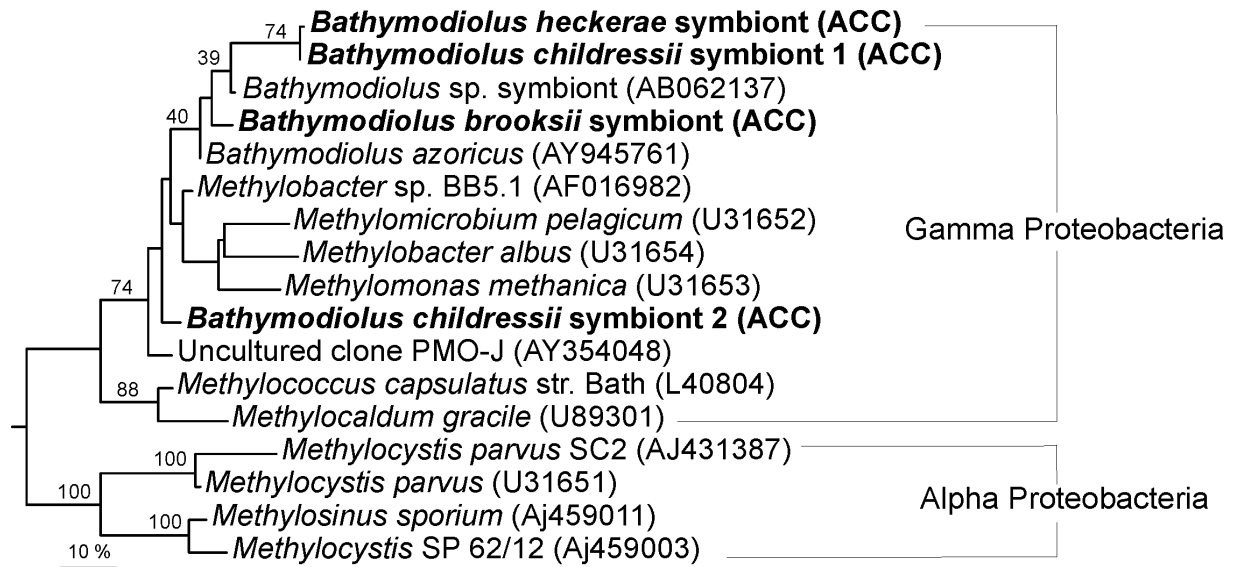


Fig. 3: Maximum likelihood tree of *pmoA* amino acid sequences from Gulf of Mexico mussel symbionts and free-living type I methanotrophs (γ -Proteobacteria). The two types of *pmoA* sequences found in Type II methanotrophs (see discussion) were used as an outgroup (α -Proteobacteria). Bootstrap percentages were obtained from 200 replicates analysed with the same settings. Scale bar represents 10 % estimated amino acid substitution.

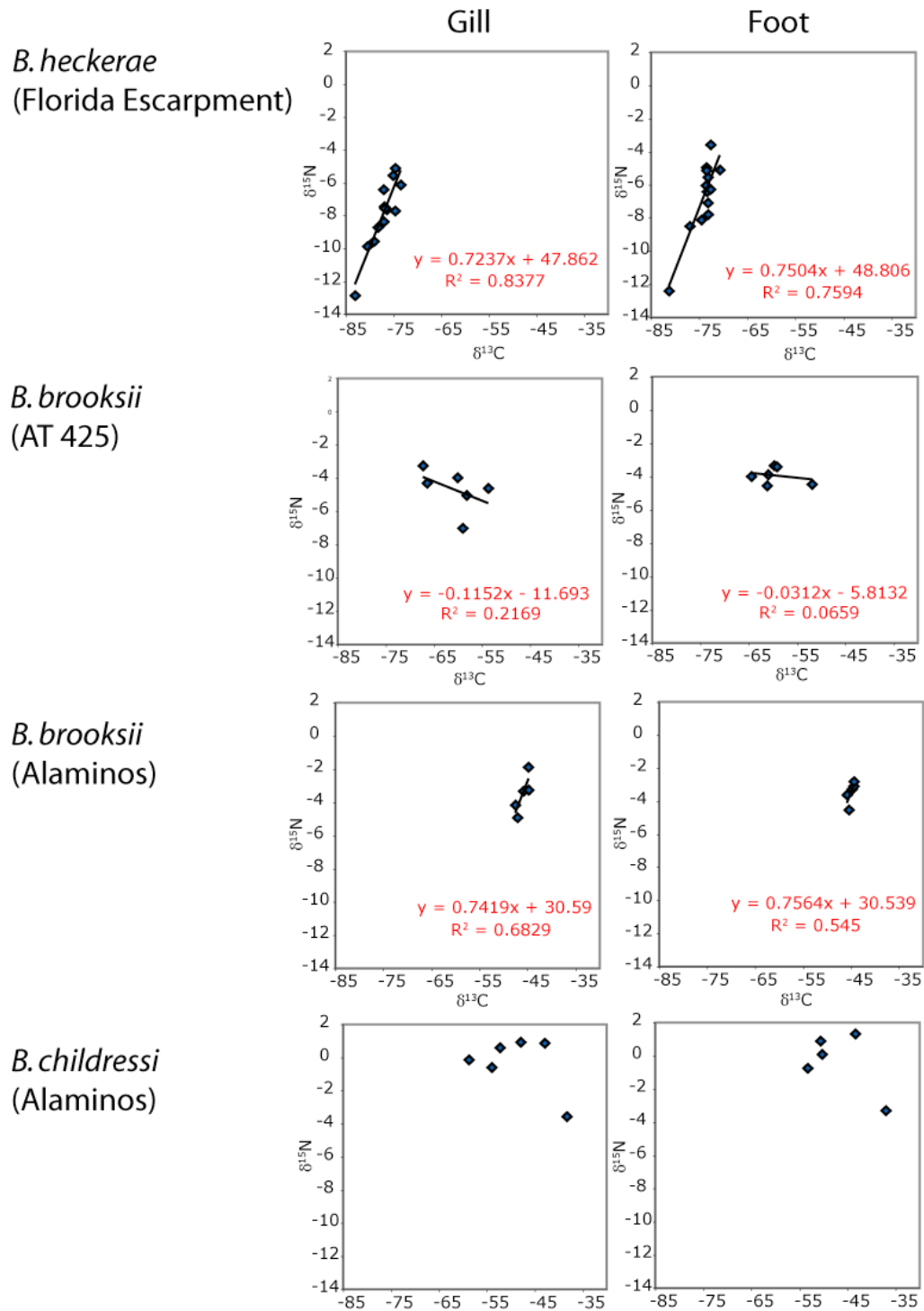


Fig. 4: Correlation between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values measured from gill and foot tissue

3.3.2 – Travaux complémentaires : développement d'une méthode visant à utiliser l'ARNr 16S comme biomarqueur chez les mytilidés associés à des bactéries symbiotiques

Duperron S., B. J. MacGregor, M. Sibuet, N. Dubilier

Résultats préliminaires

La quantification du rôle respectif des différents symbiontes et de leur métabolisme à la biomasse de l'hôte peut fournir une information importante sur le degré de dépendance des espèces symbiotiques à l'égard de leurs partenaires bactériens, et donc de leur environnement. L'étude de la variabilité de cette contribution viendrait compléter l'étude de la variabilité d'abondances relative des différents symbiontes en fonction des paramètres de l'environnement. On pourrait ainsi mettre en parallèle les variations observables de densité ou d'abondance bactérienne avec les variations de leur contribution au métabolisme des métazoaires. L'utilisation des biomarqueurs, notamment lipidiques est une voie prometteuse. Néanmoins, la complexité des voies de biosynthèse des lipides, le fort fractionnement isotopique qui y est associé, ainsi que la faible résolution phylogénétique des lipides constituent des handicaps et compromettent encore la validité des conclusions que l'on pourrait tirer.

Le développement récent d'une méthode basée sur l'isolement spécifique d'ARN ribosomique 16S à l'aide de sondes oligonucléotidiques, et sur son utilisation pour effectuer des mesures de composition isotopique, ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude du cycle du carbone au sein des communautés microbiennes (Fig. 3.7) (MacGregor et al. 2002). Au cours de ce travail, cette méthode mise au point sur des cultures d'*E. coli* a été employée pour tenter de mesurer la signature isotopique du carbone entrant dans la composition des ARNr des différents partenaires (hôte et symbiontes) de la symbiose chez *Bathymodiolus heckeriae* et *B. brooksii*, deux mytilidés symbiotiques peuplant les sites de fluides froids du Golfe du Mexique dont les symbioses ont été décrites au cours du chapitre précédent. L'objectif est d'estimer la contribution relative des différents symbiontes au pool de carbone de l'hôte. En raison de l'importante biomasse de bactéries dans les branchies, ainsi que de leur faible diversité, les branchies des mytilidés symbiotiques constituent de bons modèles pour la mise au point de la méthode.

La capture d'ARN ribosomique non dégradé s'est avérée possible. De plus, la spécificité des sondes utilisées a été testée. La quantité d'ARNr capturée reste faible, et une grande quantité de tissus branchiaux, de l'ordre de quelques grammes, a dû être employée pour aboutir à chaque mesure. Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ mesurées pour l'ARNr 16S issu des

symbiontes méthanotrophes sont négatives, comme on pouvait s’y attendre, et sont relativement bien corrélées aux valeurs mesurées pour des tissus entiers, du moins chez *B. brooksii*. Les valeurs mesurées à partir de l’ARNr 16S des bactéries symbiotiques méthanotrophes sont cependant nettement moins négatives que celles mesurées à partir des tissus ou des lipides biomarqueurs (voir 3.3.1 et Fig. 6 du manuscrit). Une contamination de l’échantillon par du carbone provenant d’un réactif, comme par exemple le RNAlater utilisé pour conserver l’ARN, est vraisemblable. Des tests seront nécessaires pour mettre en évidence cette contamination éventuelle, mais aussi pour optimiser encore davantage le processus de capture (choix des sondes, conditions d’hybridation et de capture...). Si les résultats obtenus se confirmaient, cela pourrait indiquer que les symbiontes méthanotrophes utilisent des ribonucléotides synthétisés par un autre organisme, comme l’hôte ou un autre symbionte. En dépit des incertitudes qu’il conviendra de lever, la méthode semble prometteuse, particulièrement pour l’étude des communautés alliant forte biomasse et faible diversité spécifique.

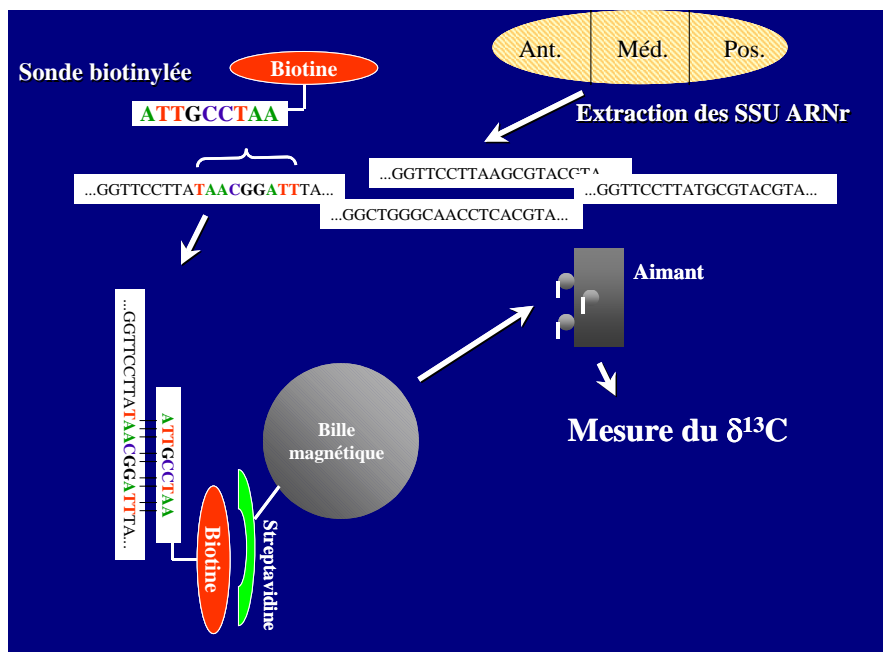


Fig. 3.7 : Schéma du processus de capture par billes d’ARN ribosomique. L’ARN extrait de la branchie est hybridé à une sonde spécifique biotinylée. Les hybrides se lient à des billes recouvertes de streptavidine qui sont ensuite récupérées à l’aide d’un aimant. L’ARN capturé est ensuite élué dans l’eau, et la composition isotopique du carbone qui le compose mesurée.

Use of 16 rRNA as a biomarker in symbiotic mussels : method development and first results

Preliminary work, S. Duperron, B. J. MacGregor, M. Sibuet, N. Dubilier

Introduction

Biomarkers are organic compounds that are known to be produced by certain species, and that can be isolated from a sample to ascertain the presence of given organisms. Their isotopic composition usually reflects that of the source carbon and nitrogen, and the specific effect of metabolic pathways. Biomarkers are thus often used to follow the flow of carbon or nitrogen in microbial ecosystems, either using naturally occurring isotopes, or after incubation with radiolabelled substrates (Boschker et al. 2002; MacGregor et al. 2002).

Among biomarkers, lipids have been used in a variety of studies to unravel carbon and nitrogen pathways in ecosystems, including studies focusing on symbiotic associations of vestimentiferan tubeworms, shrimps or mussels, and studies focusing on the role of methane in cold seep ecosystems (Abrajano et al. 1994; Jahnke et al. 1995; MacAvoy et al. 2002 #244; Pond et al. 1998; Pond et al. 1997). Lipids offer some phylogenetic resolution, being characteristic of certain types of bacteria, and are relatively easy to extract. Furthermore, they are very stable over time, allowing for the study of ancient organic matter. However, lipids suffer numerous drawbacks. The interpretation of lipid data can be tricky, as lipid composition may change depending on various parameters, and very distinct species can display identical lipids. Also, lipid biosynthesis is a complex process often associated with strong isotopic fractionations, leading to values that are different from those displayed by the whole organism (Hayes 2001). Biomarkers such as photosynthetic pigments or bacterial cell wall components can also be used, but are not as informative (Boschker et al. 2002).

As when used for characterizing communities, DNA sequences are the most resolute phylogenetic markers available. The direct use of DNA as a biomarker is possible, but limited to studies of bulk DNA, as separation based on sequence is difficult, and low amounts are the common rule. Radajewski and coworkers developed a method named Stable Isotope Probing (SIP) to allow for the separation of 'heavy DNA' after incubation of the sample with a radiolabelled substrate, in order to isolate the DNA of species able to use the substrate (Radajewski et al. 2000). However this method is not sensitive enough to allow for the

discrimination between naturally occurring stable isotope ratios, and incubation with radiolabelled substrates is still necessary.

Ribosomal RNA combines the advantages of being abundant in cells and having a high phylogenetic resolution, being used as the standard phylogenetic marker in microbial ecology (Amann et al. 1995; MacGregor et al. 2002). Also, biosynthetic pathways are relatively conserved among species, and the instability of RNA guarantees that recovered RNA derives from the active fraction of the microbial community. A method based on the isolation of specific rRNA targeted by an oligonucleotidic probe bound to magnetic beads, developed on *E. coli* cultures, proved to be successful and informative, allowing the purification and stable isotope analysis of specific rRNA (MacGregor et al. 2002). The abundance of bacteria and the efficiency of probes are critical to the success of the isolation step.

Symbiotic invertebrates from chemosynthesis-based environments, such as *Bathymodiolus* mussels, harbour dense communities of a low diversity of bacteria. In cold seep species, the dominant symbionts are methanotrophic bacteria which use bio- or thermogenic methane as a carbon source and electron donor (Fisher 1990; Duperron et al. 2005; Duperron et al. in prep). Both types of methane display markedly negative $\delta^{13}\text{C}$ signatures, very distinct from the signatures commonly measured from dissolved organic matter of photosynthetic origin. Such negative values are also measured in mussel tissue, evidencing the importance of methanotrophy in their carbon nutrition, although precise estimates of this contribution are lacking for most symbiotic invertebrates. The distinctive signature of methane-derived material, as well as the important biomasses of symbionts make such mussels suitable samples for the use of 16S rRNA as a biomarker. In this study, our aim was thus to adapt the method described in MacGregor et al., 2002 to symbiotic mytilids from the Gulf of Mexico in order to measure the stable isotope composition of rRNA from host mussels and bacterial symbionts, in order to assess the relative contribution of symbionts to their hosts biomass.

Material and methods

Sampling and storage

Samples used for this work are whole gills taken from the same series of individuals used in the previously described study about the Gulf of Mexico mussels (see 'Material and methods' section in paragraph 3.3.1)(Duperron et al. in prep). Dissected gills were either directly frozen at -80°C , or placed in tubes containing 5 to 10 mL of RNAlater™ (Ambion, UK) prior to freezing to guarantee the stability of RNA. Gills from 3 specimens of *Bathymodiolus heckeræ* from Florida Escarpment (M8, M9 and M10), 3 specimens of *B. brooksii* from Atwater Canyon (M20, M21, M22) and 3 from Alaminos Canyon (M27, M28, M29), as well as two specimens of *B. childressii* (M38 and M39), all stored in RNAlater, were further investigated.

RNA extraction

RNA was extracted from whole gill tissue using the following protocol. Up to 12 g of gill tissue was disrupted using a MSK cell homogenizer (B. Braun Biotech, Germany) (8 x 45s) in a mixture containing 25 mL phenol saturated with pH 5.1 buffer (500 mM NaAc, 100 mM EDTA), 1.75 mL SDS 20%, 15 mL pH 5.1 buffer and 25g of glass beads (0.1 and 0.4 mm diameter). After centrifugation (25 min, 15,000g, 4°C), the supernatant was transferred to a new tube, and an equal volume of 25:24:1 phenol: chloroform: isoamylalcohol was added. After vortexing, tubes were centrifugated (15 min, 15,000g, 4°C). Supernatant was transferred to a new tube, and an equal volume of 24:1 chloroform: isoamylalcohol was added. Tubes were vortexed and centrifugated as previously. RNA was precipitated using 1 vol. ammonium acetate and 2 vol. isopropanol and the pellets were cleaned with 70 % ethanol. Pellets were resuspended in 2 mL sterile water. Quality of the extracted RNA was controlled by acrylamide gel electrophoresis, or using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent, USA), and protein contamination was checked on a spectrophotometer by measuring A_{260}/A_{280} ratios.

Bead capture of rRNA using several probes

RNA and hybridization buffer (5X SSC, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.1% NaCl, 0.02% SDS, formamide) were mixed, and incubated for denaturation (70°C , 10 min) before biotin-labelled probe was added. Best recovery rates were obtained for initial concentrations of 20 % formamide, volumes of 100 μL of RNA and 900 μL hybridization buffer and 15 pmol of probe. Hybridization occurred overnight at room temperature (RT).

Streptavidin-coated magnetic beads (DynaBeads (DynaL biotech) or streptavidin coated particles (Roche)) were washed with 0.5X SSC, and 100 μ L aliquots were incubated in 0.1% blocking reagent (1H, RT). Blocking solution was then removed, hybridization mix was added, and samples were incubated (2h, RT).

Hybridization mixture was then removed, beads were washed 3 times in 5X SSC and resuspended in 100 μ L RNase-free water. RNA was then eluted on a heating block (90°C, min, shaker on), and precipitated with isopropanol and ammonium acetate. Bead-captured RNA was quantified using the Agilent bioanalyzer or Nanodrop ND-1000 (Nanodrop technology, USA), and its quality controlled by gel electrophoresis and by measuring A260/A280 ratios. To test for the possibility to perform several consecutive bead captures from the same RNA aliquot, bead capture was performed 3 times in a row from a sample.

Beside probes used in the previous study (Eub338 and Euk1209), several symbiont-specific probes were tested (Tab. 1). Probes were chosen to maximize the number of mismatches to non target symbionts shown to be present in a previous study (Duperron et al. in prep).

Control of recovered RNA by RT-PCR, cloning and sequencing

To control the specificity of the probe Bmeth-1291 targeting the methanotrophic symbionts, RT-PCR was performed from the RNA captured with the probe from two specimens of *B. heckerae* using the following procedure. After denaturation, RNA template and the GM4R primer were hybridized on ice. Buffer, dNTP, RNAsin and the reverse transcriptase were added, and reverse transcription was performed at 42°C for 2 hours. A PCR was then performed to amplify the 16S rRNA gene, the product was purified and cloned as described elsewhere (Duperron et al. in prep). A total of 15 clones were partially sequenced, and compared to symbiont sequences.

Stable isotope analysis

Bead capture was run from several aliquots of each gill's RNA. Once the total amount of captured RNA was in the range of 10 μ g, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ stable isotope analysis were attempted from the recovered RNA using a mass spectrometer.

Results

Quality of extracted RNA

Due to problems during transport, most gill samples arrived thawed in the lab. RNA was extracted from both 'frozen-only' gill tissue and from 'RNAlater-stored' gill tissue. RNA extracted from samples stored in RNAlater was in very good shape, displaying the four expected dominant bands (16S, 18S, 23S and 28S), and a A_{260}/A_{280} ratio above 1.8. RNA stored directly was, comparatively, very degraded and displayed on smear on gels. No bead capture could be obtained from this type of sample with any of the probes.

Integrity of captured rRNA and probe specificity

Captured RNA formed sharp bands on the gel, indicating that no significant degradation occurred. Furthermore, a RNA sample was let run in the same conditions, but without hybridization. Comparison between starting RNA and RNA after the bead capture process confirmed that no degradation seemed to occur during the process.

Size band analysis of the bead-captured RNA indicated that the Uni probe captured mostly 16S rRNA. Euk1209 captured 18S rRNA from host mussels, and Eub338 captured 16S rRNA, indicating that these two probes were specific. Among symbiont-specific probes, only the methanotroph-specific probe Bmeth-1291 did capture 16S rRNA. This RNA was analyzed using RT-PCR, and the 15 sequenced clones all displayed the sequence of the methanotrophic symbiont, confirming the specificity of the probe. Except for Bmeth-1291, all other symbiont-specific probes failed to capture any rRNA.

Bead capture efficiency and yield, purity of the recovered RNA

When RNA bead capture was performed more than once from a given RNA aliquot, only the RNA captured from the first reaction formed a visible band on acrylamide gel, indicating that iterating bead capture from a sample does not allow for the recovery of more target rRNA. Quantifications confirmed that yield of the second iteration does not exceed 5 to 10% that of the first. The A_{260}/A_{280} ratio was above 1.6 in most cases, indicating little protein contamination. However, ratios measured after capture with the Eub338 probe were lower, probably because the capture seemed to be less efficient.

Total amounts of captured rRNA used for stable isotope measurement are displayed in Tab. 2. Amounts collected with the Bmeth-1291 probe are the highest, probably due to a better probe efficiency.

Stable isotope analysis

Carbon and nitrogen isotope ratios measured in frozen and RNAlater stored gills indicate a moderate effect of RNAlater on the signatures, in the range of a few per mil. Reliable stable isotope measurements were obtained from most RNA samples for which amounts above 8 μg were available (in red in table 3 and 4). RNA amounts captured with the Euk1209 and Eub338 were often below 8 μg , and due to the detection limit of the mass spectrometer the stable isotope values were not considered reliable. Carbon signatures measured from the rRNA of methanotrophic range from -27.9 to -40.1 per mil (Tab. 3), and values measured for nitrogen are markedly positive, from 20. to 33.5 (Tab. 4). Correlation between $\delta^{13}\text{C}$ values measured from gill and from the methanotroph rRNA was not significant if all specimens from both species are considered (Fig. 5). However, if only specimens of *B. brooksii* are considered, a positive correlation exists (Fig. 5, stable isotope results are summarized in fig. 6).

Discussion

As evidenced in MacGregor et al. 2002, bead-capture using universal and bacterial probes allows to retain specifically the target rRNA, even in a RNA-rich sample such as a symbiotic invertebrate. The use of RT PCR to assess the specificity of a newly developed methanotroph-specific probe confirmed that it is also possible to selectively capture a target 16S rRNA sequence from the pool of extracted bacterial rRNA. Indeed, all sequences examined from the clone library obtained after the RT PCR were from methanotrophic symbionts, although sequences from non-methanotrophic symbionts represented around 30% of sequences in 16S rRNA clone libraries constructed from gill tissue from these specimens in a previous study (Duperron et al. in prep). The probes designed to target other symbionts failed to capture sufficient amounts of rRNA to form visible bands on gels or using the Agilent. However, the 16S rRNA from these symbionts was previously shown to represent less than 20% of the total 16S rRNA from bacterial symbionts in both *B. heckerae* and *B. brooksii*, indicating that scarcity of target rRNA, relative to methanotroph rRNA, might explain the lack of success.

The $\delta^{13}\text{C}$ values measured from the rRNA from methanotrophs are negative. For *B. brooksii*, specimens from Alaminos Canyon, which have less bacteria (Duperron et al. in prep) and less negative carbon signatures in their gill tissues than specimens from Atwtaer Canyon, have less negative signatures for methanotroph rRNA $\delta^{13}\text{C}$. This correlation confirms the direct link between symbiont and host carbon. Because methanotrophs rely on thermogenic or biogenic methane, which has a signature ranging from -40 to -110 per mil (Sassen et al. 1999), negative signatures were expected. Furthermore, the measured values are more negative than values reported elsewhere for cultures of *E. coli* using the same technique (MacGregor et al. 2002), indicating that we did actually measure rRNA. However, the values are not as negative as expected. The values displayed by gill tissue (Tab. 3, Fig. 6), as well as values reported elsewhere for steroid lipids which are characteristic for methanotrophic symbionts in Gulf of Mexico mussels are much more negative (Duperron et al. in prep). Contamination by carbon from the sample or one of the reagents with a more positive $\delta^{13}\text{C}$ signature, such as residual RNAlater, might have counterbalanced the negativity of the rRNA signature, and introduce a bias. If the values were real, this would indicate the possibility that methanotrophic symbionts acquire their nucleotides from an external source

with a less negative signature, maybe the host. Control experiments will be performed to check for eventual contamination.

Although this work confirms that the use of 16S rRNA as a biomarker in environmental samples is possible, the need to obtain more than 10 μg of target rRNA (better is above 25 μg) to allow for the reliable measurement of $\delta^{13}\text{C}$ on today's spectrometers is a major difficulty. In our case, more than 2 grams of tissue were needed to actually extract enough RNA to allow for the recovery of a measurable amount of rRNA. Using several probes multiplies this amount. Further optimization of the capture efficiency is needed. The choice of probes is also crucial, as different probes display very different efficiencies. Another question is about the use of oligonucleotidic probes. Stronger binding would maybe be obtained with polynucleotidic probes, but their phylogenetic resolution would be much lower.

At this stage, the use of 16S rRNA as a biomarker in environmental samples seems to be tractable, at least in samples containing high abundances of a relatively low diversity of bacteria, such as symbiotic invertebrates or biofilms, in which cases it can be used to follow the carbon pathways. Applying this method to other types of environmental samples will necessitate further improvement, and might in the end be limited to certain types of samples.

Probe	Target symbionts	Probe sequence	Mismatches to other symbionts	Reference
Bthio-468	Thiotroph	CGT CAA GGC TAA TGG G	7	This study
Bthio-1289	Thiotrophs	GAT CCG GAC TAC GAA AAG G	6	This study
Bthio-831	Thiotrophs	GAG GTA AAT CCT CCC AAC	7	This study
Bthio-1123	Thiotrophs	CCA TGA TGT GCT GGC AAA	6	This study
Bchem1-193	<i>B. brooksii</i> thiotrophs <i>B. heckerae</i> T2	CGA AGA TCC TCC ACT TTA	3	Duperron GoM
BheckC1-193	<i>B. heckerae</i> T1	AAG AGG GCT CCT TTT	6	Duperron GoM
BheckMy-822	<i>B. heckerae</i> M2	GCA AGT TGG CAA CCC TTT	7	Duperron GoM
Bmeth-1291	Methanotrophs	GCA ATC CGG ACT AAG ATC G	6	Duperron GoM

Tab. 1: Probes used for bead capture. The fourth column indicates the minimum number of mismatches to other symbionts present in the mussels. Symbiont names are according to Duperron et al. in prep.

Species	Specimen	Euk1209	Eub338	Bmeth1291
<i>B. heckerae</i>	M8	3750 (1.44)	1637 (1.1)	9990 (1.5)
	M9	2303 (1.9)	1657 (0.8)	16340 (1.6)
	M10	0	1937 (1)	10514 (1.6)
<i>B. brooksii</i> (AT)	M20	3735 (1.5)	4707 (1.6)	11328 (1.8)
	M21	8257 (1.9)	686 (1.3)	36045 (1.9)
	M22	25125 (1.9)	4140 (1.6)	33525 (1.9)
<i>B. brooksii</i> (AL)	M27	4808 (1.6)	3305 (1.8)	8125 (1.6)
	M29	2378 (1.8)	2980 (1.6)	6930 (1.6)

Tab. 2: Amount of captured rRNA used for stable isotope analyses in ng, values in parenthesis are the A_{260}/A_{280} ratios.

Species	Specimen	Foot	Gill	Gill (RNAlater)	Euk	Eub	Meth
<i>B. heckerae</i>	M8	-76.9	-73.5	-76.1	-30.8	-25.3	-30.7
	M9	-75.0	-73.1		-37.7	-25.8	-32.7
	M10	-83	-81.2			-25.1	-32.3
<i>B. brooksii</i> (AT)	M20	-53.7	-51.8	-53.6	-29.8	-27.8	-32.7
	M21	-58.2	-59.7	-57.6	-43.2	-27.6	-39.1
	M22	-59.0	-61.2	-65.0	-53.4	-33.6	-40.1
<i>B. brooksii</i> (AL)	M27	-45.8	-44.8	-46.1	-30.2	-29.9	-29.5
	M29	-44.8	-44.4	-46.2	-27.6	-27.0	-27.9

Tab. 3: $\delta^{13}\text{C}$ values measured from whole tissue of foot and gill, data from Duperron et al. in prep, and values from specific captured rRNA. Reliable values are displayed in red. AT: Atwater Canyon; AL: Alaminos Canyon

Species	Specimen	Foot	Gill	Gill (RNAlater)	Euk	Eub	Meth
<i>B. heckerae</i>	M8	-7.5	-6.0	-2.9	3.3	10.1	24.3
	M9	-5.6	-5.4		2.0	13.1	33.5
	M10	-12.9	-12.4			10.3	-0.6
<i>B. brooksii</i> (AT)	M20	-4.6	-4.5	-2.2	1.3	4.3	32.1
	M21	-5.0	-3.4	-3.9	5.6	9.1	20.7
	M22	-7.0	-4.6	-2.7	7.8	6.8	5.6
<i>B. brooksii</i> (AL)	M27	-3.3	-3.3	-1.6	0.8	3.9	4.3
	M29	-1.9	-2.8	-2.3	1.0	-0.5	2.3

Tab. 4: $\delta^{15}\text{N}$ values measured from whole tissue (foot and gill), data from Duperron et al., in, and values from specific captured rRNA. Reliable values are displayed in red. AT: Atwater Canyon; AL: Alaminos Canyon

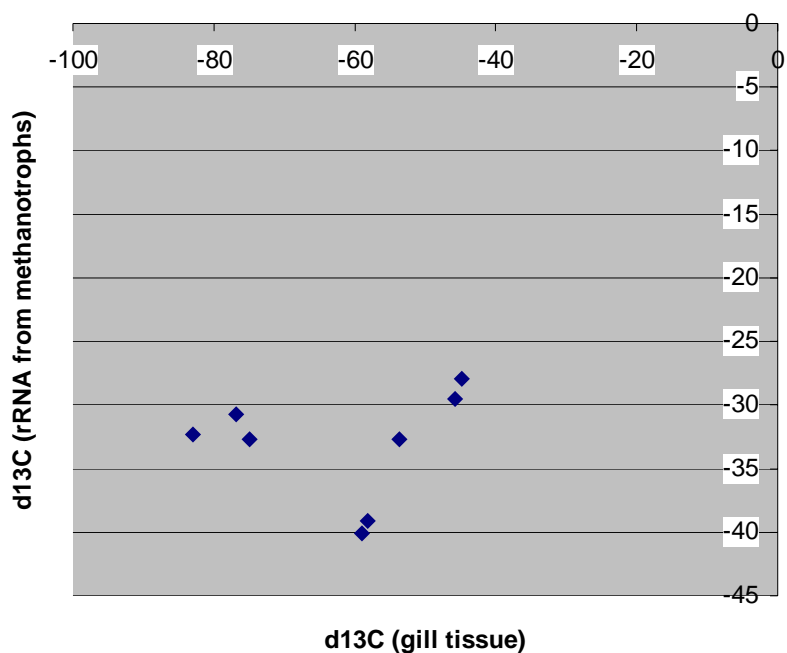


Fig. 5: relationship between $\delta^{13}\text{C}$ values measured from bead-captured rRNA from methanotrophs and values measured from gill tissue

RNA vs. tissue

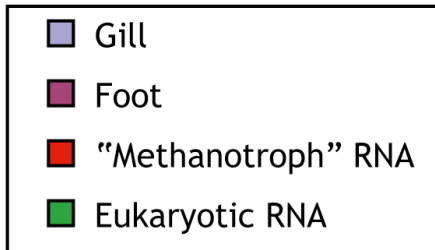
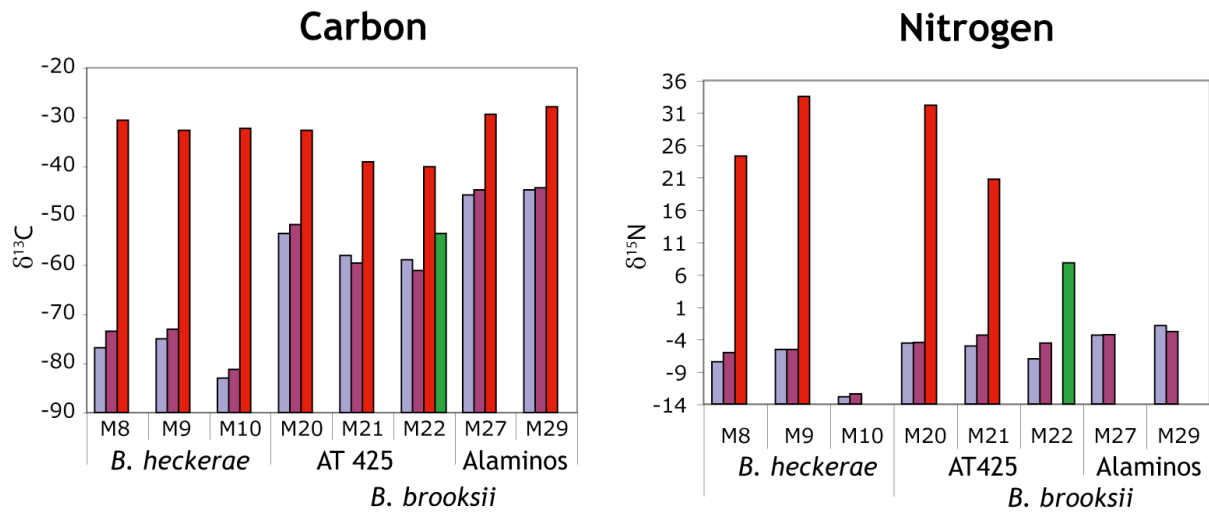


Fig. 6: graph summarizing the $\delta^{13}\text{C}$ values measured from foot and gill tissue, methanotroph rRNA and eukaryotic rRNA.

3.4 – Idas sp., mytilidé de petite taille des pockmarks de l'est de la Méditerranée : quelles bactéries sont associées à ce proche parent des Bathymodiolus ?

Article 'Coexistence of thiotrophic, methanotrophic, methylotrophic and CFB bacteria as gill endosymbionts in *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae), a mussel from a pockmark area in the eastern Mediterranean'

Duperron, S. K. Olu, N. Dubilier, M. Sibuet

Article en préparation

Outre les *Bathymodiolus*, la famille des mytilidés comporte divers genres de moules de petite taille peuplant les environnements à base chimiosynthétique, tel *Idas*. Ces genres sont encore peu connus, et l'existence de symbioses, si elle est souvent suspectée, n'a été démontrée que dans un petit nombre de cas, comme celui d'*Idas washingtonia* associée à des bactéries probablement sulfoxydantes (Deming et al. 1997). L'occurrence de représentants de ces genres sur les carcasses de baleine ou les bois coulés, ainsi que la démonstration de leur proximité phylogénétique avec *Bathymodiolus* ont conduit à proposer l'hypothèse qu'ils pouvaient représenter des stades évolutifs intermédiaires entre les mytilidés côtiers dépourvus de symbiontes et les *Bathymodiolus* (Distel et al. 2000). L'étude de leur symbiose pourrait donc nous renseigner sur l'apparition et l'évolution des symbioses dans cette famille de bivalves. Au cours de la campagne Nautinil menée au large du delta du Nil (Ifremer 2003, chef de mission J. P. Foucher), quelques spécimens de mytilidés appartenant au genre *Idas* mesurant environ 1 cm ont été collectés dans les lacunes des croûtes carbonatées prélevées à 2129 mètres de profondeur dans la 'zone centrale', une zone de pockmarks riches en méthane caractérisée par l'abondance de telles croûtes colonisées par des vestimentifères (Annelida : Siboglinidae). Les bactéries associées à ces mytilidés ont été caractérisées par séquençage de leur ARNr 16S et de trois gènes fonctionnels : le sous-unité A de la méthane monooxygénase, l'APS réductase et la RubisCO, respectivement caractéristiques des métabolismes bactériens méthanotrophe, sulfoxydant, et autotrophe. La présence des symbiontes dans les tissus a été confirmée par FISH, à l'aide de sondes spécifiques.

Six types distincts de bactéries ont été mis en évidence à l'intérieur des bactériocytes de l'épithélium branchial. Ils incluent quatre types de bactéries apparentées à des symbiontes déjà identifiés chez *Bathymodiolus* : une bactérie méthanotrophe, quantitativement dominante, deux sulfoxydantes distinctes, et une bactérie proche des *Methylophaga* et du

symbionte M2 identifié chez *B. heckerae* (voir III.3.3.1). Les deux autres types de bactéries sont nouveaux : d'une part une Gamma Protéobactérie proche de séquences environnementales, et enfin une bactérie appartenant à la division CFB (*Cytophaga Flavobacter Bacteroides*) proche de bactéries cultivées dont certaines sont connues pour dégrader les polymères végétaux. A l'exception du symbionte proche de M2 de *B. heckerae*, la présence de tous ces types de bactéries dans les branchies a été confirmée par FISH. L'identification d'une séquence unique de *pmoA* proche de celles des symbiontes de *Bathymodiolus* confirme l'existence probable d'un seul type de symbionte méthanotrophe, et l'identification de deux séquences d'APS proche de séquences de Gamma Protéobactéries celle de deux symbiontes sulfoxydants. Deux séquences distinctes de RubisCO ont été identifiées, mais des problèmes lors du clonage et du séquençage font que la description n'est probablement pas exhaustive ; de plus leur position phylogénétique ne permet pas de les rattacher à l'un ou l'autre des symbiontes, puisque les phylogénies obtenues avec le gène de la RubisCO ne reflètent pas celles obtenues avec les marqueurs de référence comme l'ARNr 16S, du fait de l'existence de transferts horizontaux pour ce gène (Delwiche and Palmer 1996).

La symbiose chez *Idas* sp. est complexe, puisqu'elle implique six partenaires bactériens dont quatre sont proches de symbiontes de *Bathymodiolus*, et présente le même degré d'intégration que celle de *Bathymodiolus* puisque ces bactéries sont localisées à l'intérieur de bactériocytes dans l'épithélium branchial. Elle ne représente donc pas un stade intermédiaire. L'identification d'une bactérie du groupe CFB dans cette symbiose constitue une nouveauté, puisque ces bactéries n'ont jamais été identifiées en symbiose avec les mytilidés. Cette symbiose atypique est peut être à relier à l'habitat de bois coulés occupé par certains *Idas*, puisque de nombreuses bactéries du groupe des CFB sont capables de dégrader les polymères végétaux.

Coexistence of thiotrophic, methanotrophic, methylotrophic and CFB bacteria as gill endosymbionts in *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae), a mussel from a pockmark area in the eastern Mediterranean

Sébastien Duperron^{1,2}

Karine Olu¹

Nicole Dubilier²

Myriam Sibuet¹

¹IFREMER Département Environnement Profond, Centre de Brest, B.P. 70, 29263 Plouzané, France

²Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

Introduction

The genus *Idas*, formerly *Idasola*, (Bivalvia: Mytilidae) is a group of small mussels known from sunken woods and whale bones in the Pacific and Adriatic sea (Deming et al., 1997; Distel et al., 2000; Bolotin et al., 2005), as well as cold seeps in the Gulf of Mexico and Eastern Mediterranean (Gustafson et al., 1998; Olu-LeRoy et al., 2004). These mussels are close relatives to the symbiont-associated mussels of the genus *Bathymodiolus*, which occur worldwide at cold seep and hydrothermal vent sites and have been the subject of intensive study in the last two decades (Fisher, 1990; Van Dover, 2000; Von Cosel, 2002). Members of the genus *Bathymodiolus* are large mussels, up to 36 cm (Von Cosel and Olu, 1998), and their characteristic feature is their association with chemosynthetic endosymbionts, mainly methanotrophic and sulfide-oxidizing gamma proteobacteria (Fisher, 1990; DeChaine and Cavanaugh, 2005). It is often assumed that small mussels such as *Idas* and other genus have a recent common ancestor with *Bathymodiolus*, and that whale falls and sunken woods may have served as evolutionary stepping stones for the colonisation of deep sea cold seeps and vents by chemosynthesis-fueled mussels (Distel et al., 2000). Although a species of *Idas* (*I. washingtonia*) from a whale fall in the Santa Catalina Basin was shown to harbour sulfide-oxidizing chemoautotrophic bacteria based on TEM observation and enzyme assays (Deming et al., 1997), symbiosis in these mussels remains poorly investigated, and a real assessment of the diversity, role, activity and abundance of symbiotic bacteria is lacking. Especially, it is not yet known whether these mussels harbor symbionts with specific metabolisms adapted to their particular environment. The investigation of the phylogenetic relationship between symbionts of *Idas* and symbionts of *Bathymodiolus* would also help to understand the evolutionary steps leading to the establishment of symbioses in mytilids.

Several geological structures are known to be associated with cold seeps in the Eastern Mediterranean (brines, pockmarks, mud volcanoes), and to shelter symbiont-associated metazoans (Olu-LeRoy et al., 2004; Werne et al., 2004; Zitter et al., 2005). During the Nautinil cruise in 2003, several cold seep sites were explored in the vicinity of the Nile deep-sea fan (Huguen et al., 2004; Loncke et al., 2004). One of the sites, located north of the Nile Delta, displayed pockmarks structures characterized by abundant authigenic carbonate crusts (pers. obs. During the Nautinil cruise) (Aloisi et al., 2002). These crusts harbored an abundant macrofauna, mainly consisting of vestimentiferan tubeworms and galatheid crabs. Small mussels identified as *Idas*, up to 1.5 cm length, were found in anfractuositities of carbonate crusts, likely experiencing a methane-rich environment (Aloisi et al., 2004; Zitter et al., 2005). In the present study, we aimed at characterizing the diversity of symbionts associated with this species using 16S rRNA sequencing and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on gill tissue. The potential of the symbiont population to perform methanotrophy, autotrophy and sulfide oxidation was assessed by sequencing specific functional genes.

Materials and Methods

Samples

Six specimens of *Idas* sp., a small mussel up to 1.5 cm in length, were collected with the manned submersible Nautille during the Nautinil cruise (2003, chief scientist: J. P. Foucher) to the eastern Mediterranean. Mussels occurred in irregularities in authigenic carbonate crusts to which they were fixed by byssal threads. Two crusts, associated with vestimentiferan tubeworms, were collected from a methane-rich pockmark area located north of the Nile deep sea fan during dive 14 (32°38.4N, 29°55.0E, 2129m depth). Upon recovery, mussels were dissected, one gill and a fragment of the foot were frozen for DNA and stable isotope analysis, and the second gill and a part of the foot were fixed for FISH (see below). Shells and some entire specimens were saved to allow for the exact determination of the species by taxonomists.

Gene amplification, cloning and sequencing

DNA was extracted individually from gill tissue of four specimens using a FastDNA® SPIN KitPrep (Qbiogene, CA) with bead beater disruption of the cells. The gene encoding 16S rRNA was amplified from each specimen as described elsewhere (Duperron et al., 2005). The gene encoding particulate methane monooxygenase subunit A (*pmoA*) was amplified from three mussel following the protocol described in (Duperron et al., in prep). Genes encoding RubisCO form I and APS reductase were amplified from each mussel using primers and PCR conditions described in (Elsaied and Naganuma, 2001) and (Deplancke et al., 2000), respectively, using 33 PCR cycles. For these two genes, due to the low amount of PCR product obtained, reactions from the four specimens were pooled together prior to cloning.

PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) and cloned using the TOPO-TA kit (Invitrogen, California). Inserts from positive

clones were partially sequenced using the plasmid-specific primer M13F. A total of 170 clones of 16S rRNA, and 32 clones per functional gene were partially sequenced and aligned. Chimeric sequences were identified either by visual examination of the alignments or using ChimaeraCheck (Cole et al., 2003). Representative clones were fully sequenced (Table 1).

Sequence analysis and phylogenetic reconstruction

Sequences of 16S rRNA were compared with the RDP database (Cole et al., 2003), and amino acid sequences from functional genes were compared to the NCBI database (www.ncbi.nlm.nih.gov) using BLAST (Altschul et al., 1990). Best hits were included in phylogenetic analysis. Sequences were aligned manually in Bioedit (Hall, 1997-2001) or using ClustalX.

Phylogeny of the 16S rRNA sequences was reconstructed using a maximum likelihood (ML) approach based on a general time reversible model, and an eight-category discrete approximation of a Γ law to account for rate heterogeneities. Analysis was performed with TreeFinder (Jobb, 2003). Phylogenies of amino acid sequences of RubisCO (237 aa), APS reductase (129 aa) and methane monooxygenase (154 aa) were reconstructed using a ML method and a Jones-Taylor-Thornton model with the ProML tool of the PHYLIP package (Felsenstein, 2002). Bootstrap values were obtained from 200 replicates analyzed using the same method.

FISH

From each mussel, an entire gill was fixed on board, included in polyester wax, and sectioned following the protocol used in (Duperron et al., in prep). Sections 7 μ m thick were cut with a microtome (Leica, Germany), collected on Superfrost® Plus slides (Roth,

Germany), rehydrated in decreasing ethanol series, and hybridized as described in (Duperron et al., 2005) with a buffer containing 20% formamide.

Three FISH probes, ImedM-138, ImedA-193 and ImedT2-193, were newly designed by modification of previous probes designed for other mussel symbionts (Duperron et al., 2005; Duperron et al., in prep). These probes target the M3.33, M4.36 and M1.17 phlotypes, respectively (see table 1 for sequences). Dual hybridizations were performed to check that no cross hybridization between probes occur. Three probes from previous studies, Bthio-193, BhecM2-822 (Duperron et al., in prep) and CF319 (Manz et al., 1996), were used to target phlotypes M1.2, M2.41 and M1.25, respectively.

Stable isotope analysis

Gill and foot tissue of a specimen were acidified overnight in 0.1N HCl, rinsed, dessicated for 48 hours in a 46°C chamber. Samples were then ground, and stable isotope values of nitrogen and carbon were measured in a Finnigan Delta S isotope ratio mass spectrometer. Tissue from several individuals were pooled to gather enough material to allow for a reliable measurment.

Results

Diversity of symbiotic bacteria based on 16S rRNA sequencing

Six distinct 16S rRNA gene phylotypes were sequenced from the gill tissue of *Idas* sp. (Tab. 1). Comparative sequence analysis and phylogenetic reconstruction indicated that five phylotypes belong to the γ Proteobacteria division, while the sixth is a CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) (Fig. 1). Among the γ proteobacterial phylotypes, M1.2 is related to various thiotrophic symbionts of *Bathymodiolus*, sharing 99.1% sequence similarity with the T2 symbiont from the Florida Escarpment mussel *B. heckerae* (Duperron et al., in prep). A second phylotype, M1.17, is closely related to Z2525c, an environmental sequence from the Namibian Upwelling previously shown to be related to thiotrophic symbionts of mussel (98.8% similarity, BS value of 90) (Duperron et al., 2005). Although M1.2 and M1.17 are both related to thiotrophic symbionts of *Bathymodiolus*, they only share 97.1% sequence identity to each other. The M3.33 phylotype belongs to the clade of methanotrophic symbionts of *Bathymodiolus*, and its closest relative is the symbiont of *B. childressii* (98.4% similarity, BS values of 98). The last two γ proteobacterial phylotypes belong to two separate groups. M2.41 is related to a clone sequence from the Haakon Mosby Mud Volcano, with which it shares 96.8% similarity (Lösekann *et al.* unpublished). This phylotype clusters within a larger clade, related to free-living *Methylophaga*, including the M2 symbiont of *B. heckerae* (94.6% similarity), a recently identified type of symbiont (Duperron et al., in prep). Phylotype M4.36 is related to environmental sequences from the Arctic Ice (clone 96B-16, 98.8% similarity) (Bano and Hollibaugh, 2002) and from the Monterey Bay (EB080-L11B01, 98.7% similarity) (Suzuki et al., 2004). The last phylotype, M1.25, is not a γ Proteobacteria. It belongs to the CFB division, and is related to the sequences of *Polaribacter dokdonensis*

(92.1% similarity) and *Tenacibaculum* sp., two unpublished species recovered from the Dokdo island and tidal flats, respectively.

APS reductase, Methane monooxygenase and RubisCO gene sequence analysis

A single *pmoA* sequence was recovered in the three clone libraries obtained from the three mussels, sharing 96.8 % amino acid sequence identity with the sequence obtained from the Mid-Atlantic Ridge vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Spiridonova *et al.*, unpublished). This sequence clusters within the monophyletic group which includes all but one *pmoA* sequences available from *Bathymodiolus* symbionts (Duperron *et al.*, in prep). This group, although weakly supported (BS 35), appeared consistently using several amino acid substitution models and reconstruction methods (Fig. 2).

Variability exists within the 11 full nucleic acid sequences of APS recovered from *Idas*. Three positions among 390 differ, but when translated, only a single amino acid is different indicating that two sequences likely occur. The best ‘blast hits’ to these two sequences are sequences from *Allochromatium vinosum* (Hipp *et al.*, 1997) and an environmental clone from a Dolomite aquifer occurring 896 meters below surface (Gihring *et al.*, unpublished), both displaying 87.6 % amino acid sequence identity. These two sequences are also the closest relatives to the sequences from *Idas*, and they together cluster within the clade of γ Proteobacterial APS sequences (Fig. 3).

Two distinct RubisCO sequences were retrieved. Due to problems in sequencing reactions, many clones yielded bad sequences, so the diversity of RubisCO genes is likely underestimated. The two nucleic acid sequences RubM38 and RubM58 share 93.5% identity, and the amino acid sequences share 94.8% sequence identity. Their closest relative is the sequence of the α proteobacterium *Rhodobacter blasticus* (89 and 91% amino acid sequence identity, respectively) (Uchino and Yokota, 2003), while sequences from γ proteobacteria, in

particular from the thiotrophic symbiont of the bivalve *Solemya velum*, are more distantly related (81.7 and 82.1% amino acid sequence identity, respectively) (Fig. 4) (Schwedock et al., 2004).

Fluorescence in situ hybridization

Symbionts identified with FISH occurred exclusively in the apical part of the bacteriocytes located in the gill epithelium, and no signals were observed outside of the bacteriocytes. The bacteria M3.33, targeted by the methanotroph-specific probe ImedM-138, was identified in all bacteriocytes of all specimens investigated. It displayed the characteristic donut-shape already observed for methanotrophic symbionts of mussels and appeared to be, by far, the most abundant symbiont (Fig.5A-B). The ImedA-193 probe targeting the M4.36 symbiont hybridized with a bacterium displaying a short rod morphology in some bacteriocytes in all specimens. Bacteria are located randomly within the apical part of the bacteriocyte, and do not form dense clusters (Fig.5C). The CFB-related symbiont M1.25 was identified using the CFB319 probe (Manz et al., 1996) in the gills of the four specimens investigated, but abundances varies between specimens. This symbiont was spread over the apical part of bacteriocytes, not forming dense clusters, but many bacteria were seen (Fig.5D). Thiotroph-related symbionts M1.17 and M1.2 were also detected in the apical part of bacteriocytes, and appeared as small cocci (Fig. 5E-F). Symbiont M2.41 has not yet been detected in any specimen, but further attempts will be undertaken to identify this symbiont.

Stable isotope signatures

Gill tissue from the analyzed individual displayed a $\delta^{13}\text{C}$ value of -38.32 ‰ and a $\delta^{15}\text{N}$ value of 1.00 ‰. Foot tissue displayed values of -34.04 ‰ and 1.21 ‰, respectively.

Discussion

Specimens of *Idas* sp. collected on carbonate crusts sampled in a pockmark area, north of the Nile delta, harbor six distinct bacterial phlotypes, the highest bacterial diversity ever found associated with a mytilid bivalve. Up to now, five of these phlotypes were confirmed to correspond to endosymbionts: M3.33, M1.17, M1.2, M4.36 and M1.25. These bacteria appear to occupy the apical part of bacteriocytes, in a similar way to the symbionts of *Bathymodiolus* (Fisher, 1990). The phlotype M3.33 belongs to the monophyletic clade of methanotrophic symbionts associated with *Bathymodiolus* mytilids from cold seeps and hydrothermal vents (Distel and Cavanaugh, 1994). The M1.17 and M1.2 phlotypes are different from each other, but are both closely related to thiotrophic symbionts of *Bathymodiolus* mussels, a case similar to that reported for the two thiotrophic symbionts of *B. heckerae* (Duperron et al. in prep.). The M4.36 symbiont is present in low numbers in some bacteriocytes in all mussels investigated. This symbiont belongs to a clade not previously known to include symbionts. All its relatives are uncultivated environmental bacteria, so no inference about its metabolism or function can be made. This bacteria however represents a new type of symbiont. The M1.25 symbiont belongs to the CFB division (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*), and is to date the only example of a CFB bacteria involved in symbiosis in a chemosynthesis based ecosystem. CFB are however known as symbionts in termites (Ohkuma et al., 2002), in beetles (Hurst et al., 1999), in cockroaches (Bandi et al., 1994) and in acanthamoebae (Horn et al., 2001). The CFB symbiont identified in this study is related to members of the genus *Polaribacter*, which includes psychrophilic bacteria able to degrade polymers such as starch (Gosink et al., 1998), and *Tenacibaculum*, which includes free-living bacteria but also algae- and sponge-associated bacteria as well as fish pathogens (Suzuki et al., 2001; Avendano-Herrera et al., 2004; Frette et al., 2004). This new type of

symbiont is particularly surprising as many members of the CFB division are known to degrade plant polymers (Madigan et al., 2002). Some species of the genus *Idas* are known to occur on sunken woods (Distel et al., 2000). Examples of wood-degrading symbiosis between bivalves (family Teredinidae) and cellulolytic proteobacteria are well-documented in the wood-boring bivalves of the genera *Bankia* (Sipe et al., 2000) and *Lyrodus* (Distel et al., 2002). Our results emphasize the need to further investigate symbiosis in mytilids occurring in atypical chemosynthetic environments such as whale bones and sunken woods to look for unusual types of environment-specific associations, such as those described in the ‘bone-eating’ siboglinid polychaete *Osedax* which harbors hydrocarbon-degrading proteobacteria (Goffredi et al., 2005). Although no FISH results are available for the M2.41 phylotype, its relationship to the M2 symbiont of *B. heckeriae*, a recently identified type of symbiont moderately related to *Methylophaga* and thought to be a methylotrophic bacteria able to use methanol derived from the activity of methanotrophs or C1 compounds present in the environment, advocates for its symbiotic nature (Duperron et al., in prep). However, the probe used was shown to work well in a previous study (Duperron et al., in prep), so the absence of a signal raises doubts. Another possibility would be that this symbiont is very rare.

Visual examination of gill sections hybridized with the methanotroph specific probe, and comparison with signals observed with the eubacterial probe indicate unambiguously that the methanotroph-related symbiont is the dominant symbiont in the gills of *Idas* sp. The identification of a single *pmoA* sequence related to sequences recovered from *Bathymodiolus* mussels supports the hypothesis of a methanotrophic endosymbiont. Negative stable isotope values measured for carbon in mytilid specimens, in the range of values expected from thermogenic methane which occurs in this area (Prinzhofer, pers. comm.), also indicate the likely importance of methanotrophy for the nutrition of *Idas* sp. Dominance of methanotrophy in the nutrition of symbiotic *Bathymodiolus* from cold seep sites is a well documented

phenomenon (Cavanaugh et al., 1987; Cary et al., 1988; Fisher and Childress, 1992; Distel and Cavanaugh, 1994; Duperron et al., in prep), but until now *Idas* mussels were thought to only harbor thiotrophic endosymbionts based on TEM observation and enzyme assays (Deming et al., 1997).

The recovery of two APS sequences, although they only differ by one amino acid and three nucleotide positions, is coherent with the recovery of two distinct thiotroph-related 16S rRNA sequences. Their relationship to APS sequences of gamma proteobacteria also indicates that they likely derive from the symbionts, confirming the potential for thiotrophy.

Two RubisCO Form I sequences were retrieved, but sequencing problems do not exclude the possibility of other sequences. Although RubisCO is often considered as a marker for the presence of thiotrophic endosymbionts (Schwedock et al., 2004), it is also identified in the genome of methanotrophs such as *Methylococcus capsulatus* (Ward et al., 2004). Furthermore, the phylogeny of RubisCO is inconsistent with phylogenies obtained from classical markers such as 16S rRNA due to multiple events of horizontal gene transfer and duplication (Delwiche and Palmer, 1996; Uchino and Yokota, 2003). It is illustrated in our tree, which shows that the closest relative of our sequences is a sequence from an α proteobacterium. It is thus impossible to assign a RubisCO sequence to a bacteria in a diverse sample. So although the presence of RubisCO supports the existence of autotrophy, it can not be used to confirm the presence of thiotrophic symbionts.

This study is the first molecular description of symbiosis in a mussel from the genus *Idas*. A dense and diverse community of bacteria of at least six distinct types was identified, including two new types of symbionts previously unknown in bivalves, and four bacteria closely related to endosymbionts of *Bathymodiolus* mussels. The close relationship between these four symbionts and the *Bathymodiolus* symbionts, as well as the intracellular occurrence of symbionts in the apical part of bacteriocytes indicate that *Idas* harbors a symbiosis that is

very similar to that of *Bathymodiolus*. Among other mytilids, *Idas* has been suggested to represent an evolutionary intermediate form between non symbiotic coastal mussels and the large *Bathymodiolus* from cold seeps and hydrothermal vents (Distel et al., 2000). The study of symbioses in other genus of small mussels related to *Bathymodiolus* might lead to the discovery of more primitive forms of symbiosis, that would help to better understand the evolution of symbiosis in invertebrates from chemosynthetic ecosystems.

Acknowledgements

We thank the captain and crew of the R. V. *L'Atalante* and the R. O. V. *Victor 6000* and the chief scientist for their help during the Nautinil cruise (Ifremer, 2003, chief scientist: J. P. Foucher). This cruise was part of the EU project Mediflux. We thank the Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (Ifremer, Brest) for allowing us to use facilities. Many thanks to P. Riera and C. Leroux (Université Pierre et Marie Curie, Station Biologique de Roscoff) for their contribution to the stable isotope analysis. This research has been supported by grants from Ifremer (M. S., K. O., S. D.), the Max Planck Society (N. D.), and the International Max Planck Research School of Marine Microbiology Ph.D. program (S.D.), which we gratefully acknowledge.

- Aloisi, G., Pierre, C., Rouchy, J.M., Foucher, J.P., and Woodside, J. (2004) Methane related authigenic carbonates of Eastern Mediterranean Sea mud volcanoes and their possible relation to gas hydrate destabilisation. *Earth Planet. Sci. Lett.* **184**: 321-338.
- Aloisi, G., Bouloubassi, I., Heijs, S., Pancost, R.D., Pierre, C., Sinninghe Damsté, J.S. et al. (2002) CH₄-consuming microorganisms and the formation of carbonate crusts at cold seeps. *Earth Planet. Sci. Lett.* **203**: 195-203.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Avendano-Herrera, R., Rodriguez, J., Magarinos, B., ROmalde, J.L., and Toranzo, A.E. (2004) Intraspecific diversity of the marine fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 871-877.
- Bandi, C., Damiani, G., Magrassi, L., Grigolo, A., Fani, R., and Sacchi, L. (1994) Flavobacteria as intracellular symbionts in cockroaches. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **257**: 43-48.
- Bano, N., and Hollibaugh, J.T. (2002) Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl. Env. Microbiol.* **68**: 505-518.
- Bolotin, J., Hrs-Brenko, M., Tutman, P., Glavic, N., Kozul, V., Skaramuca, B. et al. (2005) First record of *Idas simpsonii* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae) in the Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **85**: 977-978.
- Cary, S.C., Fisher, C.R., and Felbeck, H. (1988) Mussel growth supported by methane as sole carbon and energy source. *Science* **240**: 78-80.
- Cavanaugh, C.M., Levering, P.R., Maki, J.S., Mitchell, R., and Lidstrom, M.E. (1987) Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* **325**: 346-347.

- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A. et al. (2003) The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* **31**: 442-443.
- DeChaine, E.G., and Cavanaugh, C.M. (2005) Symbioses of methanotrophs and deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae). In *Molecular Basis of Symbiosis*. Overmann, J. (ed): Springer-Verlag, p. in press.
- Delwiche, C.F., and Palmer, J.D. (1996) Rampant horizontal transfer and duplication of RubisCO genes in eubacteria and plastids. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 873-882.
- Deming, J.W., Reysenbach, A.L., Macko, S.A., and Smith, C.R. (1997) Evidence for the microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor: bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. *Microsc. Res. Tech.* **37**: 162-170.
- Deplancke, B., Hristova, K.R., Oakley, H.A., McCracken, V.J., Aminov, R., Mackie, R.I., and Gaskins, H.R. (2000) Molecular Ecological Analysis of the Succession and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in the Mouse Gastrointestinal Tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2166-2174.
- Distel, D., Baco, A., Chuang, E., Morrill, W., Cavanaugh, C., and Smith, C. (2000) Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? *Nature* **403**: 725-726.
- Distel, D.L., and Cavanaugh, C.M. (1994) Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *Journal of Bacteriology* **176**: 1932-1938.
- Distel, D.L., Beaudoin, D.J., and Morrill, W. (2002) Coexistence of multiple proteobacterial endosymbionts in the gills of the wood-boring bivalve *Lyrodus pedicellatus* (Bivalvia: Teredinidae). *Appl. and Env. Microbiol.*: 6292 - 6299.

- Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J.C., Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Amann, R., and Dubilier, N. (2005) Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (South East Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in the gills. *Appl. Env. Microbiol.* **71**: 1694-1700.
- Duperron, S., Wetzel, S., Sibuet, M., MacGregor, B.J., Kuypers, M., Fisher, C.R., and Dubilier, N. (in prep) Diversity, relative abundance, and metabolic capabilities of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussels (Bivalvia: Mytilidae) from cold seeps in the Gulf of Mexico.
- Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., McKiness, Z.P., DeChaine, E.G., Cavanaugh, C.M., and Dubilier, N. (in prep) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge.
- Elsaied, H.E., and Naganuma, T. (2001) Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit genes from deep-sea microorganisms. *Appl. Env. Microbiol.* **67**: 1751-1765.
- Felsenstein, J. (2002) PHYLIP (Phylogeny Inference Package). In. Seattle: Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington.
- Fisher, C.R. (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev. Aquat. Sci.* **2**: 399-613.
- Fisher, C.R., and Childress, J.J. (1992) Organic carbon transfer from methanotrophic symbionts to the host hydrocarbon-seep mussel. *Symbiosis* **12**: 221-235.
- Frette, L., Jorgensen, N.O., Irming, H., and Kroer, N. (2004) *Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 519-524.

- Goffredi, S.K., Orphan, V.J., Rouse, G.W., Jahnke, L., Embaye, T., Turk, K. et al. (2005) Evolutionary innovation: a bone-eating marine symbiosis. *Environ. Microbiol.* **7**: 1369-1378.
- Gosink, J.J., Woese, C.R., and Staley, J.T. (1998) *Polaribacter* gen. nov. with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides groups and reclassification of '*Flectobacillus glomeratus*' as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 223-235.
- Gustafson, R., Turner, R., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1998) A new genus and five new species of mussels (Bivalvia, Mytilidae) from deep-sea sulfide/hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico. *Malacologia* **40**: 63-112.
- Hall, T. (1997-2001) BioEdit.
- Hipp, W.M., Pott, A.S., Thum-Schmitz, N., Faath, I., Dahl, C., and Truper, H. (1997) Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfide-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* **143**: 2891-2902.
- Horn, M., Harzeneter, M., Linner, T., Schmid, E.N., Müller, K.D., Michel, R., and Wagner, M. (2001) Members of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* phylum as intracellular bacteria in acanthamoebae: proposal of '*Candidatus Amoebophilus asiaticus*'. *Environ. Microbiol.* **3**: 440-449.
- Huguen, C., Mascle, J., Chaumillon, E., Kopf, A., Woodside, J., and Zitter, T. (2004) Structural setting and tectonic control of mud volcanoes from the Central Mediterranean Ridge (eastern Mediterranean). *Mar. Geol.* **209**: 245.
- Hurst, G.D., Bandi, C., Sacchi, L., Cochrane, A.G., Bettrand, D., Karaca, I., and Majerus, M.E. (1999) *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited flavobacteria that kill males only. *Parasitology* **118**: 125-134.

- Jobb, G. (2003) TREEFINDER version March 2003. *Munich, Germany. Distributed by the author at www.treefinder.de.*
- Loncke, L., Mascle, J., and Party, F.S. (2004) Mud volcanoes, gas chimneys, pockmarks and mounds in the Nile deep-sea fan (Eastern Mediterranean): geophysical evidences. *Mar. Petrol. Geol.* **21**: 669-689.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (2002) *Brock Biology of Microorganisms*: Pearson Education.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., and Schleifer, K.H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* **142**: 1097-1106.
- Ohkuma, M., Noda, S., Hongoh, Y., and Kudo, T. (2002) Diverse bacteria related to the *Bacteroides* subgroup of the CFB phylum within the gut symbiotic communities of various termites. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 78-84.
- Olu-LeRoy, K., Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Gofas, S., Salas, C., Mariotti, A. et al. (2004) Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: composition, symbiosis, and spatial distribution on mud volcanoes. *Deep-Sea Res. I* **51**: 1915-1936.
- Schwedock, J., Hermer, T.L., Scott, K.M., Hektor, H.J., Seitz, A.P., Fontana, M.C. et al. (2004) Characterization and expression of genes from the RubisCO gene cluster of the chemoautotrophic symbiont of *Solemya velum*: *cbbLSQO*. *Arch. Microbiol.* **182**: 18-29.
- Sipe, A.R., Wilbur, A.E., and Cary, S.C. (2000) Bacterial symbiont transmission in the wood-boring shipworm *Bankia setacea* (Bivalvia: Teredinidae). *Appl. Env. Microbiol.* **66**: 1685-1691.

- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., and Yamamoto, S. (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1639-1652.
- Suzuki, M.T., Preston, C.M., Beja, O., de la Torre, J.R., Steward, G.F., and DeLong, E.F. (2004) Phylogenetic screening of ribosomal RNA gene-containing clones from Bacterial Artificial Chromosome (BAC) libraries from different depths in Monterey Bay. *Microb. Ecol.* **In Press**.
- Uchino, Y., and Yokota, A. (2003) 'Green-like' and 'Red-like' RubisCO cbbL genes in *Rhodobacter azotoformans*. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 821-830.
- Van Dover, C.L. (2000) *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Von Cosel, R. (2002) A new species of bathymodioline mussel (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) from Mauritania (West Africa), with comments on the genus *Bathymodiolus* Kenl & Wilson, 1985. *Zoosystema* **24**: 259 - 271.
- Von Cosel, R., and Olu, K. (1998) Gigantism in Mytilidae. A new *Bathymodiolus* from cold seep areas on the Barbados accretionary Prism. *C. R. Acad. Sci. III-Vie* **321**: 655-663.
- Ward, N., Larsen, O., Sakwa, J., Bruseth, L., Khouri, H., Durkin, A.S. et al. (2004) Genomic insights into methanotrophy: the complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *PLoS Biol.* **2**: E303.
- Werne, J.P., Haese, R.R., Zitter, T., Aloisi, G., Bouloubassi, I., Heijs, S. et al. (2004) Life at cold seeps: a synthesis of biogeochemical and ecological data from Kazan mud volcano, eastern Mediterranean Sea. *Chem. Geol.* **205**: 367-390.

Zitter, T., Huguen, C., and Woodside, J. (2005) Geology of mud volcanoes in the eastern Mediterranean from combined sidescan sonar and submersible surveys. *Deep-Sea Res. Part I* **52**: 457-475.

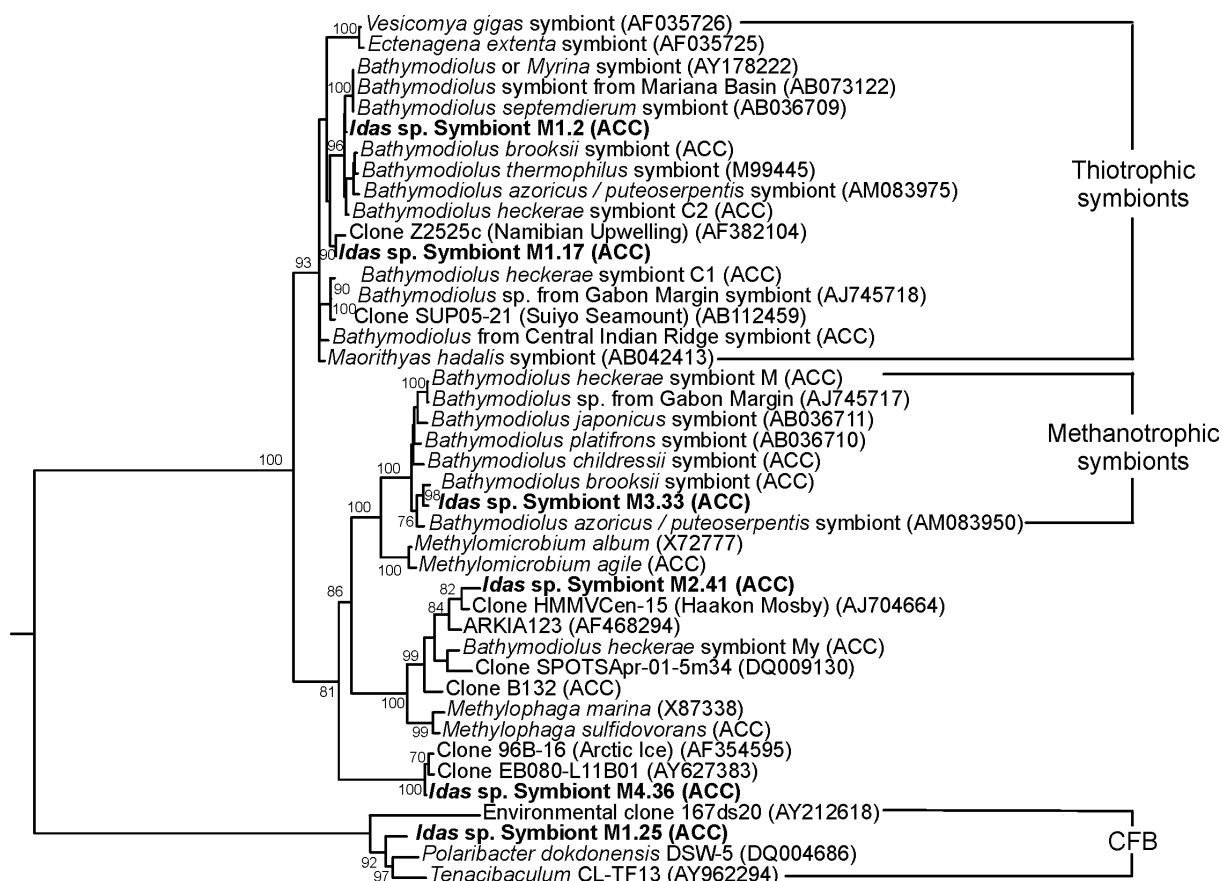


Fig. 1: Maximum likelihood tree of 16S rRNA sequences retrieved from *Idas* sp. based on 1486 nucleotide positions. Log LN=-11796. Bootstrap values were obtained from 500 replicates.

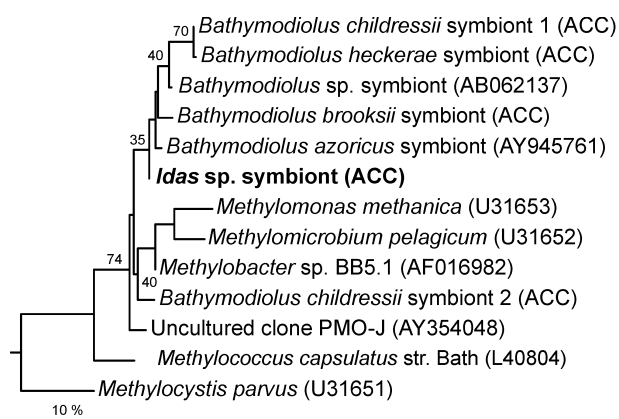


Fig. 2: Maximum likelihood tree of *pmoA* amino acid sequences from *Idas* sp. based on 154 amino acid positions. Log LN=-1578. Bootstrap values were obtained from 200 replicates. Scale bar represents 10% estimated amino acid substitution.

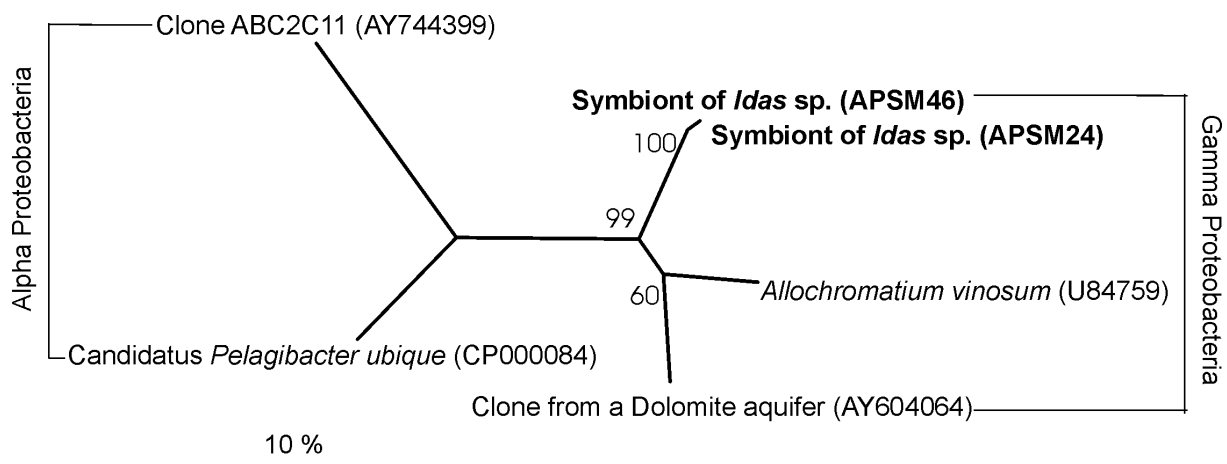


Fig. 3: Maximum likelihood tree of APS reductase amino acid sequences from *Idas* sp. based on 129 amino acid positions. Log LN=-710. Bootstrap values were obtained from 200 replicates. Scale bar represents 10% estimated amino acid substitution.

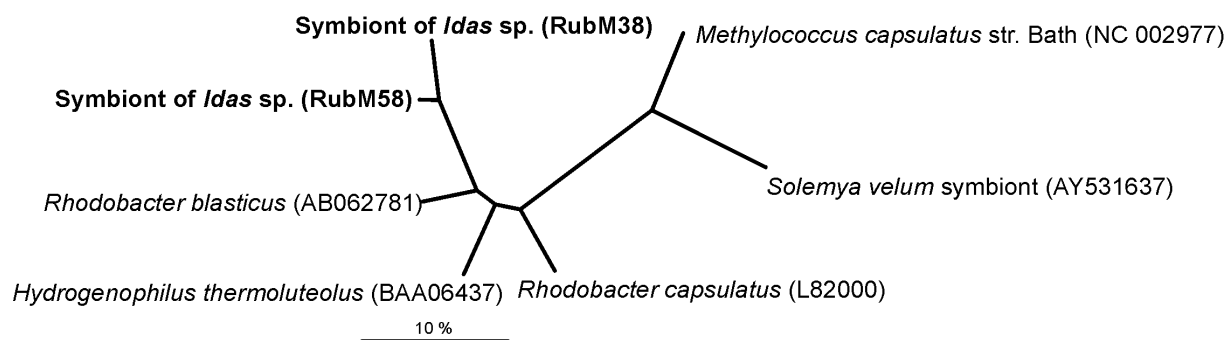


Fig. 4: Maximum likelihood tree of Rubisco amino acid sequences from *Idas* sp. based on 237 amino acid positions. Log LN=-1400. Scale bar represents 10% estimated amino acid substitution.

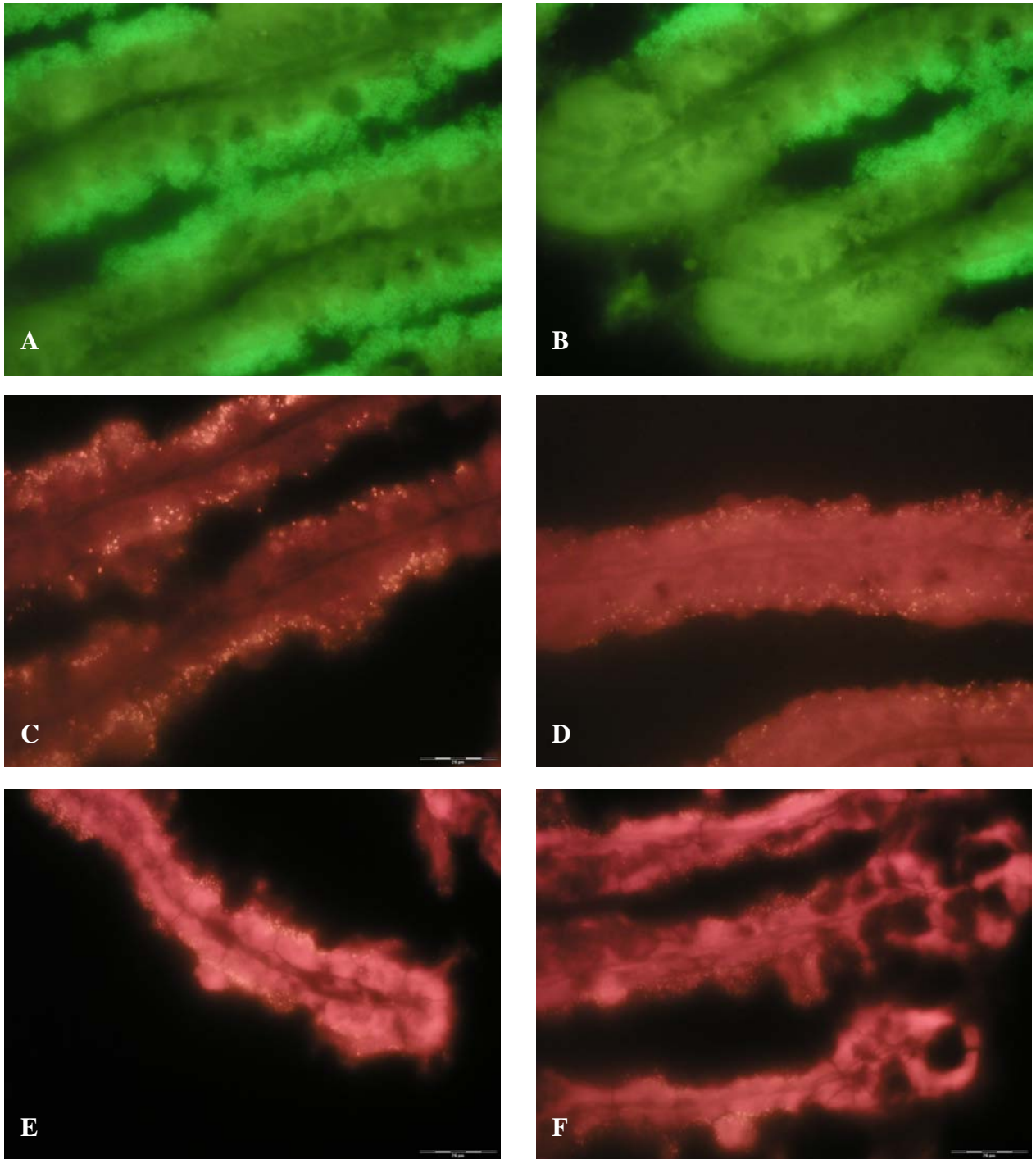


Fig. 5A-F: Gill sections of *Idas* specimens from the Eastern Mediterranean hybridized with fluorescently labelled probes displaying symbiotic bacteria located in the apical part of bacteriocytes. **A-B:** Methanotroph M3.33 specific probe. **C:** M4.36 phylotype-specific probe. **D:** CFB-specific probe. **E:** Thiotroph M1.17 specific probe. **F:** Thiotroph M1.2 specific probe. Scale bar is 20 μm .

Sequences	Mussel				Total		Blast hit	Probe	Probe sequence
	1	2	3	4	Partial	Full			
M3.33	14 (2)	24 (3)	21 (3)	5 (1)	74	9	Methanotrophic symbiont of <i>Bathymodiolus</i> sp. (AJ745717) 97%	ImedM-A38	ACC ATG TTG TCC CCC ACT AA
M4.36			4 (2)	16 (2)	20	5	Clone 96B-16 (AF354595) 98%	ImedA-193	AAC AGA TCC CCT CCT TTC
M1.25	1 (1)				1	1	Clone 167ds20 (AY22618) 92.1%	CF319	TGG TCC GTG TCT CAG TAC
M1.2	4 (4)	5	1		10	4	<i>Myrina</i> symbiont (AY178222) 98%	Bthio-193	CGA AGA TCC TCC ACT TTA
M1.17	2 (2)		1	1	4	2	Clone Z2525c (AF382104) 98%	ImedT2-193	TAG AGG CCT CCT TTA
M2.41	11 (1)	3 (2)	6 (3)	13 (2)	33	8	Clone HMMVCen-15 (AJ704664) 96%	BhecM2-822	CTC CCA CAC ACT TAG TTG
PmoA	12 (7)	10 (7)	10 (4)		32	11	Symbiont of <i>Bathymodiolus azoricus</i> (AY945761) 96.8% (aa)	-	-
APS (2 seq)	32 (11)				32	11	<i>Allochromatium vinosum</i> (U84759) 87.6% (aa)	-	-
RubisCO (2 seq)	32 (2)				32	2	<i>Rhodobacter blasticus</i> (AB062781) 89 and 90% (aa)	-	-

Tab. 1: Numbers of partial and nearly full sequences obtained from cloned PCR products amplified from gill DNA of specimens of *Idas*, best blast hits, and probes used for FISH analysis. Probes Bthio-193 and BhecM2-822 are from (Duperron et al., in prep), probe CF319 is from (Manz et al., 1996).

Chapitre IV - Discussion générale des résultats obtenus, conclusion et perspectives sur l'étude des symbioses

La complémentarité des approches utilisées au cours des différents volets composant cette étude, ainsi que l'utilisation d'échantillons provenant de contextes différents, ont permis d'appréhender plusieurs aspects des symbioses bactériennes de mytilidés. L'examen de la diversité des bactéries impliquées conduit à proposer de nouvelles hypothèses biogéographiques et évolutives sur la symbiose, et à sortir du paradigme des 'doubles symbioses' ; d'autre part, l'examen du potentiel métabolique des symbiontes, de leur abondance et de sa variabilité abordées pour la première fois de manière quantitative, permet de relier le rôle nutritionnel des symbiontes chez différentes espèces aux différents contextes géologiques et physico-chimiques. Ainsi, les relations existant entre hôtes, symbiontes et environnement sont discutées pour proposer de nouvelles hypothèses relatives à l'écologie de ces organismes.

1 - Diversité et biogéographie des bactéries symbiotiques des mytilidés

Avant cette étude, les bactéries associées à huit espèces de mytilidés avaient été caractérisées au moyen du séquençage de leur ARNr 16S : cinq espèces sont originaires de sources hydrothermales, *Bathymodiolus thermophilus* (Distel et al. 1988), *B. azoricus* (Won et al. 2003), *B. puteoserpentis* (Distel et al. 1995), *B. sepemdierum* (Fujiwara et al. 2000) et *B. aff. brevior* (McKiness and Cavanaugh 2005), et trois sont originaires de sources de fluides froids, *B. japonicus*, *B. platifrons*, (Fujiwara et al. 2000) et *B. childressii* (Distel and Cavanaugh 1994). Au cours de ce travail, une telle caractérisation a été effectuée pour sept espèces, dont quatre pour lesquelles aucune séquence n'était disponible : *Idas* sp. des sites de pockmarks de Méditerranée, *Bathymodiolus* sp., une espèce probablement nouvelle provenant de la marge Gabonaise, *B. heckerae* et *B. brooksii* des sites de fluides froids du Golfe du Mexique. Pour les trois autres espèces, *B. azoricus*, *B. puteoserpentis*, *B. childressii*, nos données ont confirmé ou complété celles déjà publiées, notamment parce que les individus analysés provenaient d'autres sites (Fig. 4.1). Par ailleurs, la confirmation systématique de la présence des symbiontes dans les tissus par la méthode d'hybridation *in situ* FISH, ici réalisée pour tous les échantillons, n'avait jusqu'alors été réalisée que pour *B. childressii* et *B. puteoserpentis* (Distel and Cavanaugh 1994; Distel et al. 1995). Cette méthode nous permet

ici de démontrer la nature symbiotique des bactéries caractérisées par séquençage. Le séquençage systématique d'un nombre important de clones, en particulier par rapport aux études antérieures, a permis d'obtenir un aperçu plus exhaustif de la diversité des bactéries symbiotiques, et notamment de découvrir de nouveaux types de symbiotes.

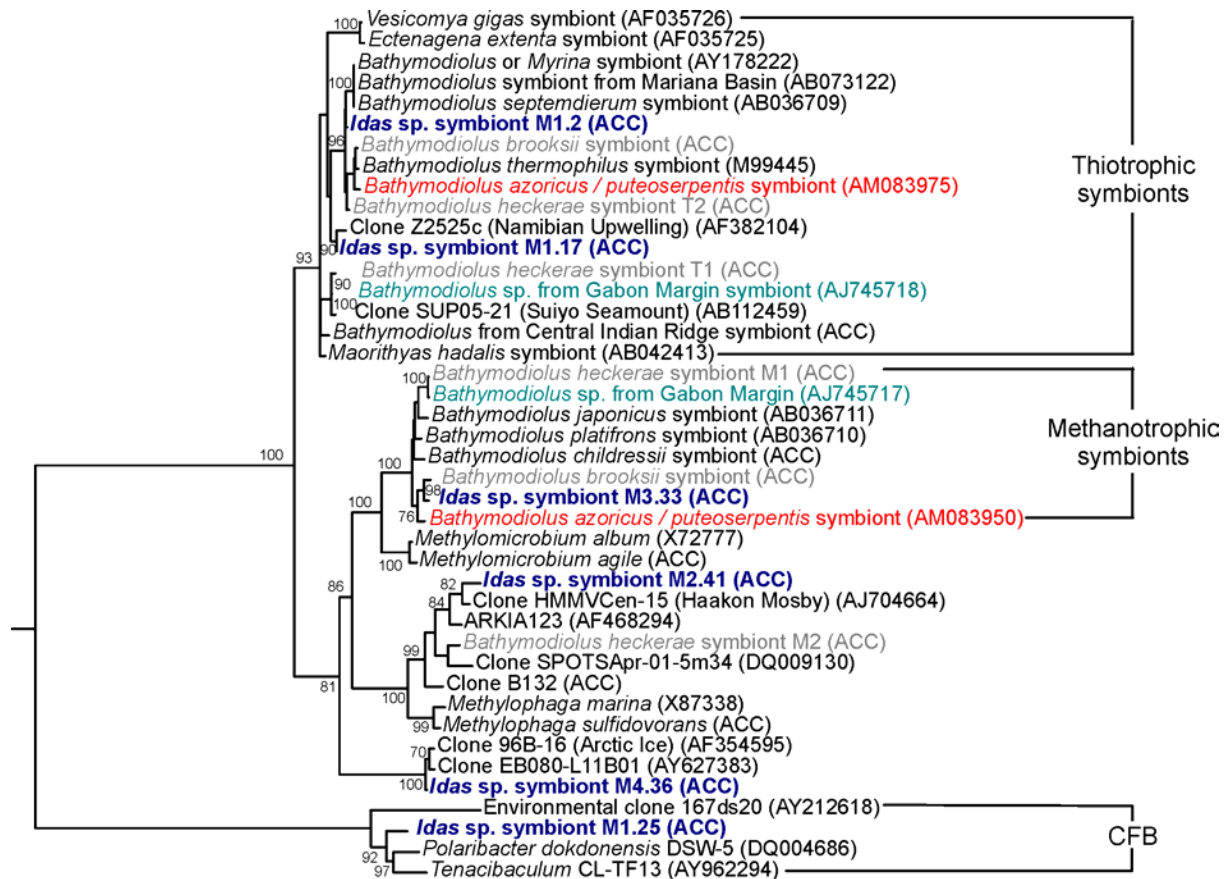


Fig. 4.1 : Arbre phylogénétique regroupant les nouveaux symbiotes séquencés au cours de cette étude (en couleur). Les symbiotes appartenant à un même hôte sont de la même couleur. La reconstruction est basée sur la méthode du maximum de vraisemblance (modèle GTR, 1486 positions utilisées).

1.1 - Diversité des bactéries symbiotiques, découverte de nouveaux groupes

Les travaux menés sur les mytilidés encore peu étudiés des sites de fluides froids ont abouti à la mise en évidence de résultats nouveaux. Ainsi, la double symbiose a été démontrée chez *Bathymodiolus* sp., un mytilidé collecté sur le site Régab, un pockmark caractérisé par l'émission de fluides froids localisé à une profondeur de 3160 mètres sur la marge Gabonaise, près du chenal du Zaïre. Par ailleurs, une diversité inattendue de bactéries symbiotiques a été découverte chez *B. heckerae*, un mytilidé collecté à 3300 mètres sur le site de Florida Escarpment (Golfe du Mexique), associée à quatre phylotypes distincts, ainsi que chez *Idas* sp., un mytilidé de petite taille peuplant les lacunes des croûtes carbonatées collectées sur une

zone de pockmarks localisée par 2129 mètres de fond au nord du delta du Nil (Méditerranée), et associée à six phylotypes. Jusqu'alors en effet, seules des associations impliquant un ou deux phylotypes bactériens avaient été décrites. Ces découvertes démontrent l'intérêt de l'approche moléculaire pour l'étude des symbioses bactériennes, et l'originalité des sites de fluides froids comme objets d'étude. Outre les symbiontes sulfoxydants et méthanotrophes déjà connus, trois nouveaux groupes de bactéries symbiotiques ont été identifiés, qui n'avaient jusqu'alors jamais été signalés en association avec des métazoaires. Le premier groupe, modérément apparenté aux bactéries libres méthylotrophes du genre *Methylophaga*, comporte des symbiontes de *B. heckerae* et d'*Idas* sp. qui font partie d'un clade regroupant également des séquences issues d'environnements tels la glace Arctique (Brinkmeyer et al. 2003), les volcans de boue (Lösekann, non publié), ou encore la colonne d'eau océanique (Brown et al. 2005). De par leur affiliation phylogénétique, et en restant prudent quant à l'extrapolation d'un métabolisme bactérien déduit de la phylogénie, on peut suggérer que ces symbiontes sont probablement méthylotrophes, donc capables d'assimiler divers composés monocarbonés à l'exception du méthane (Anthony 1982; Janvier and Grimont 1995). La localisation de ces symbiontes à l'apex des bactériocytes et au voisinage des méthanotrophes laisse penser qu'ils utilisent des composés soit issus du métabolisme des méthanotrophes, comme le méthanol, soit présents dans l'eau environnante. Un second groupe, appartenant également aux gamma protéobactéries, contient la séquence d'un symbionte de *Idas* sp. ainsi que des séquences issues de la baie de Monterey (Suzuki et al. 2004) et de la glace Arctique (Bano and Hollibaugh 2002). Ce groupe n'est apparenté à aucune bactérie dont le métabolisme est connu. Enfin, le dernier groupe est représenté par l'un des symbiontes d'*Idas* sp., qui est une bactérie de la division CFB (*Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Bacteroides*) proche des genres *Polaribacter*, qui comporte des bactéries marines libres psychrophiles décrites dans les environnements polaires et dont certaines dégradent l'amidon (Gosink et al. 1998), et *Tenacibaculum*, un genre comportant des bactéries isolées à partir d'algues vertes, d'éponges et de l'océan, mais comportant aussi des pathogènes de poissons ayant un impact en aquaculture (Suzuki et al. 2001; Avendano-Herrera et al. 2004; Frette et al. 2004). Ce dernier type de symbionte est particulièrement intéressant puisque des représentants du genre *Idas* sont connus entre autres au niveau des bois coulés (Distel et al. 2000), et que de nombreuses bactéries du groupe des CFB sont connues pour leur capacité à dégrader les polymères végétaux (Madigan et al. 2002). L'importance éventuelle de ces nouveaux types de symbiontes, ainsi que leur rôle réel sont inconnus, et leur découverte dans des zones de fluides froids ouvre la voie à la recherche de nouveaux types de symbioses chez les

métazoaires des écosystèmes à base chimiosynthétique, et à l'exploration des différences selon les contextes géologiques et de composition des fluides.

1.2 – Nouvelles données sur la biogéographie et l'évolution des symbioses

La caractérisation précise des bactéries apporte de nouveaux éléments pour interpréter la biogéographie et l'évolution des symbioses chez les mytilidés, tout en soulevant un certain nombre d'interrogations. Ainsi en se basant sur la proximité des séquences d'ARNr 16S, les mêmes bactéries symbiotiques sont associées à *B. azoricus* et *B. puteoserpentis*, les deux espèces de mytilidés peuplant les sites hydrothermaux de la ride Médio-Atlantique. Ce résultat contredit pour la première fois l'observation selon laquelle une espèce hôte est associée à ses propres bactéries, et met en doute la spécificité de ces associations. Par ailleurs, les symbiotes associés à *Bathymodiolus* sp. de la marge Gabonaise sont très proches phylogénétiquement des deux symbiotes dominants (parmi les quatre) de *B. heckerae* du Golfe du Mexique. Cette constatation soutiendrait l'hypothèse proposée par les taxonomistes selon laquelle *Bathymodiolus* sp. et *B. heckerae* appartiennent à une seule espèce en dépit de la distance entre leurs sites de collecte (Le Golfe de Guinée et le Golfe du Mexique). Cette hypothèse s'appuie sur la ressemblance morphologique des coquilles (Von Cosel, comm. pers.). Si tel est le cas, l'étude de l'étendue réelle de l'aire de répartition géographique de cette espèce ubiquiste, les relations biogéographiques unissant les différentes populations, ainsi que l'existence d'éventuels 'couloirs de migration' à travers l'océan Atlantique mérite d'être approfondie. Enfin, l'existence d'une symbiose chez *Idas* sp. de Méditerranée est une première indication de l'intérêt que pourrait avoir l'étude des symbioses chez les mytilidés appartenant à des genres proches de *Bathymodiolus* pour la compréhension de l'apparition et de l'évolution des symbioses dans cette famille de bivalves. En effet, ces mytilidés ont une position phylogénétique intermédiaire entre les mytilidés côtiers dépourvus de bactéries symbiotiques et les *Bathymodiolus* symbiotiques qui peuplent les environnements de fluides chauds et froids à des profondeurs excédant 400 mètres. De plus, ces mytilidés se trouvent également dans des écosystèmes chimiosynthétiques atypiques, comme les bois coulés ou les carcasses de baleine, souvent rencontrés dans des zones moins profondes. Il a donc souvent été proposé que ces mytilidés, associés à de tels environnements, ont joué le rôle d'intermédiaires ayant permis la colonisation des sites chimiosynthétiques profonds (Distel et al. 2000).

Au delà de son intérêt pour l'étude de la biogéographie et l'évolution des symbioses, la diversité phylogénétique des bactéries symbiotiques reflète également la diversité de leurs

métabolismes, et notamment l'utilisation de composés issus des fluides ou de l'environnement. Elle constitue donc la base à partir de laquelle on peut comprendre l'écologie des symbioses de mytilidés.

2 – Ecologie de la symbiose chez les mytilidés

2.1 – Potentiel métabolique des symbiontes

Le séquençage des gènes codant la rubisco, l'APS réductase ou la méthane monoxygénase particulière chez *Idas* sp. démontre le potentiel des populations de symbiontes à l'autotrophie, l'oxydation des sulfures, et la méthanotrophie, respectivement. Chez *B. heckerae*, *B. childressii* et *B. brooksii*, la méthane monoxygénase a été séquencée, mais la rubisco et l'APS réductase n'ont pas été recherchées. La présence de tels gènes fonctionnels d'origine bactérienne confirme donc le potentiel de la population de symbiontes à mettre en œuvre les métabolismes suggérés d'après l'étude phylogénétique de la diversité, comme l'oxydation des sulfures, la méthanotrophie ou encore l'autotrophie, même si le séquençage direct de ces gènes fonctionnels ne permet pas de prouver qu'ils s'expriment *in situ* dans les bactéries symbiotiques. De plus, relier de manière certaine chacun de ces gènes au phylotype bactérien (basé sur l'ARNr 16S) qui l'exprime nécessite l'utilisation d'une variante du FISH combinant l'hybridation d'une sonde oligonucléotidique avec l'ARNr 16S et l'hybridation d'une sonde polynucléotidique sur l'ARNm à partir d'une même section de branchie, une technique encore à l'état expérimental utilisée pour confirmer l'expression de la méthane monoxygénase par les symbiontes méthanotrophes de *B. azoricus* (Pernthaler and Amann 2004).

2.2 – Variabilité des abondances bactériennes et caractéristiques de l'environnement

Les environnements de fluides de type hydrothermal sont généralement caractérisés par l'abondance de sulfures, tandis que c'est l'abondance de méthane qui caractérise la plupart des environnements de fluides froids. Toutefois, d'un site à l'autre, les concentrations de ces composés sont très variables, comme l'illustrent les cas des sites hydrothermaux Rainbow et Logatchev (ride Médio Atlantique) dont les fluides sont très riches en méthane (Desbruyères et al. 2000). Sulfure et méthane sont les donneurs d'électrons (et, dans le cas du méthane, également la source de carbone) utilisés par les bactéries engagées dans les exemples classiques de 'double symbiose'. L'examen des variations d'abondances relatives des symbiontes sulfoxydants et méthanotrophes en fonction des concentrations en sulfure et

méthane présente donc un grand intérêt pour la compréhension de la plasticité et du rôle nutritionnel des symbioses, et la mise en évidence d'éventuelles réponses à la variabilité environnementale.

Ainsi, les variations d'abondances relatives des deux types de symbiontes, observées dans cette étude, entre mytilidés peuplant différents sites hydrothermaux de la ride Médio Atlantique (*B. azoricus* et *B. puteoserpentis*) ont pu être reliées aux différences de composition des fluides. Les symbiontes méthanotrophes représentent une fraction plus importante de la population de symbiontes dans les branchies des mytilidés peuplant les sites hydrothermaux exceptionnellement riches en méthane comme Rainbow et Logatchev, tandis que les symbiontes sulfoxydants dominent sur les sites pauvres en méthane et riches en sulfures comme Lucky Strike. Cette observation suggère fortement l'existence d'une réponse nutritionnelle aux caractéristiques du fluide hydrothermal, comme cela avait été proposé d'après des comptages réalisés en microscopie électronique (Trask and Van Dover 1999; Fiala-Médioni et al. 2002) ou des analyses isotopiques (Colaco et al. 2002). En revanche, aucune variation visible d'abondances relatives n'a été constatée entre spécimens de *Bathymodiolus* sp. peuplant différents agrégats d'une même zone de pockmarks du site Régab sur la marge Gabonaise. Ces différents agrégats étaient pourtant caractérisés par des concentrations locales et ponctuelles de méthane dans l'eau très différentes, allant de 0,7 à 33,7 μM . Cependant, l'existence probable de variations temporelles, non détectables à l'aide de nos mesures ponctuelles, pourrait avoir pour effet d'homogénéiser les concentrations sur le long terme, conduisant à des concentrations moyennes similaires sur les différents agrégats, ce qui pourrait expliquer l'absence d'une variation même si la réponse nutritionnelle existe. Enfin, l'utilisation d'une approche quantitative (slot blot) pour compléter le FISH chez les mytilidés du Golfe du Mexique a permis de confirmer la dominance des symbiontes méthanotrophes chez les deux espèces considérées, *B. heckeriae*, et *B. brooksii*, un résultat logique compte tenu de l'occurrence de ces espèces sur des sites de fluides froids (Cavanaugh et al. 1987; Fisher et al. 1993; Distel and Cavanaugh 1994). Par ailleurs, cette approche a montré que la quantité de bactéries présentes dans les branchies était variable entre les spécimens de *B. brooksii* peuplant deux sites distincts, sans que cette variation ne s'accompagne d'une variation d'abondance relative puisque les bactéries méthanotrophes dominent dans les deux cas, ni d'une quelconque altération visible de l'état physiologique des individus. L'ensemble de ces résultats, même s'ils demeurent incomplets, suggère donc fortement l'existence d'une réponse des populations de symbiontes à divers paramètres chez les mytilidés abritant des doubles symbioses. En effet, la quantité totale de bactéries, de même

que l'abondance relative des deux principaux types de symbiontes semblent susceptibles de varier, le plus probablement en fonction des paramètres du milieu, de leur variabilité spatio-temporelle, et de l'état physiologique des individus. L'exemple des mytilidés provenant du site Régab, au niveau duquel les concentrations mesurées à un instant t étaient très différentes entre agrégats alors que les abondances relatives de symbiontes étaient similaires, indiquerait néanmoins que cette réponse n'est pas instantanée.

Le suivi quantitatif des populations de bactéries méthanotrophes et sulfoxydantes associées à des mytilidés, consécutivement à un transfert depuis un site riche en méthane vers un site pauvre ou inversement, permettrait d'en savoir plus sur la dynamique de cette réponse. Une telle approche a déjà montré son intérêt en permettant le calcul des *turn over* de carbone et d'azote chez *B. childressii* (Dattagupta et al. 2004). Le suivi de la variabilité spatio-temporelle des paramètres physico chimiques sur une longue période permettrait par ailleurs de savoir si cette réponse dépend des valeurs moyennes ou bien des extrêmes atteints par ces paramètres (Fisher et al. 1988; Tryon et al. 2002).

2.3 – Rôle nutritionnel des symbiontes

L'examen du rôle nutritionnel des symbiontes constitue le prolongement logique de celui de la variabilité des symbioses. Les analyses effectuées au moyen des diverses approches basées sur les isotopes stables fournissent en effet une intégrale de l'effet de la symbiose sur l'ensemble de la vie de l'individu. Pour l'ensemble des espèces du Golfe du Mexique, les signatures isotopiques très négatives du carbone relevées au niveau des tissus branchiaux démontrent la prédominance de la méthanotrophie dans la nutrition carbonée. De plus, les signatures mesurées pour l'azote sont également négatives, indiquant l'utilisation d'une source locale d'azote, et non d'azote issu de l'activité photosynthétique de surface.

Dans le cas de *B. brooksii*, l'analyse des tissus entiers a montré que la méthanotrophie jouait un rôle moindre dans l'alimentation des spécimens collectés à Alaminos Canyon (Golfe du Mexique, 2220 m) que dans celle des individus provenant d'Atwater Canyon (Golfe du Mexique, 1930 m). Ce résultat est corroboré par l'observation, basée sur le FISH et le Slot Blot, selon laquelle les spécimens d'Alaminos Canyon abritent moins de bactéries symbiotiques que ceux d'Atwater Canyon. La combinaison de ces résultats indiquerait qu'il peut exister, pour une espèce donnée, des différences importantes et durables entre populations, même si la cause en demeure mystérieuse puisque dans ce cas précis, l'environnement n'a pu être caractérisé directement.

La quantification et l'analyse isotopique de lipides caractéristiques des bactéries méthanotrophes a permis de confirmer l'importance de la méthanotrophie dans la nutrition carbonée des mytilidés, mais aussi l'implication des symbiontes dans la biosynthèse de lipides utilisés par l'hôte, comme le cholestérol. Cependant, la biosynthèse des lipides est complexe, et fait intervenir des voies cycliques, ce qui rend difficile la mesure précise de l'effet isotopique lié à cette biosynthèse, et peut compromettre la comparaison entre différents échantillons (Boschker and Middelburg 2002). De même, les lipides caractéristiques d'un groupe précis de bactéries sont rares, et dans la plupart des cas des bactéries très différentes présentent des lipides très similaires. Face à ces inconvénients, l'utilisation de l'ARNr 16S comme biomarqueur présente l'avantage d'une voie de biosynthèse conservée entre organismes, et d'une résolution phylogénétique optimale (MacGregor et al. 2002). Cette technique utilisée dans cette étude sur *B. heckeriae*, *B. brooksii* et *B. childressi* (Golfe du Mexique) repose sur la capture de l'ARNr 16S cible au moyen de sondes oligonucléotidiques liées à des billes magnétiques. La faible diversité des bactéries associées aux mytilidés du Golfe du Mexique, ainsi que les biomasses importantes de bactéries symbiotiques ont permis d'isoler une quantité suffisante d'ARNr 16S des symbiontes méthanotrophes pour effectuer des mesures de composition isotopique en carbone. Les signatures isotopiques mesurées pour le carbone sont négatives, mais compte tenu des signatures mesurées sur les tissus entiers, des signatures encore plus négatives étaient attendues. L'explication la plus probable est une contamination par du carbone contenu dans un des produits utilisés. Néanmoins, cette méthode en cours de développement est prometteuse, et pourrait donner des résultats très intéressants, en permettant notamment de mesurer directement la composition isotopique des symbiontes afin de calculer leur contribution réelle au carbone total de leur hôte.

3 – Conclusion et perspectives sur l'étude des symbioses

La mise en évidence d'une diversité inattendue de bactéries impliquées, tant chez divers *Bathymodiolus* que chez leur proche parent *Idas* sp., et la démonstration de leur potentiel métabolique constituent des avancées dans la compréhension de la biogéographie et de l'évolution des symbioses chez ces métazoaires. L'examen de la variabilité des abondances bactériennes en lien avec leur rôle nutritionnel et les caractéristiques chimiques de l'environnement, mettant en jeu (entre autres) des outils techniques jusqu'ici jamais appliqués à cette thématique (ARNr biomarqueur, slot blot), a permis de mettre en évidence la variabilité des symbioses, leur plasticité, et de renforcer l'hypothèse de l'existence d'une réponse nutritionnelle. Ces résultats illustrent la complémentarité qui existe entre les

différentes méthodes employées, et plaide pour une approche plus intégrative basée sur leur utilisation systématique dans l'étude des symbioses de métazoaires peuplant les écosystèmes à base chimiosynthétique.

Cependant, d'autres aspects intéressants des symbioses de mytilidés restent méconnus. Les connaissances sur la biologie des partenaires de l'association, tant hôtes que symbiontes, sont encore très limitées. La recherche systématique de gènes impliqués dans la communication cellulaire, comme par exemple les gènes bactériens liés aux voies de sécrétion, permettrait de mieux comprendre la nature de l'interaction, et les mécanismes conduisant à l'établissement de la symbiose. De même, les mécanismes de la symbiose du point de vue de l'hôte sont très peu connus (Fiala-Médioni et al. 1990). Dans ce cadre, le développement d'outils permettant de mener des études expérimentales *in vivo* apporterait une aide considérable, comme elle l'a fait pour l'étude d'autres bivalves symbiotiques comme les lucinidés (Gros et al. 1996).

Plus généralement, le développement d'approches génomiques, rendues possibles par l'essor récent des grands pôles de séquençage, améliorerait considérablement notre connaissance de ces symbioses, et de leur degré réel d'intégration. Si quelques génomes de bactéries symbiotiques cultivables, notamment d'insectes, sont disponibles (Gil et al. 2004), les symbiontes de métazoaires associés aux environnements chimiosynthétiques sont incultivables, en conséquence de quoi, seule une approche métagénomique peut être adoptée (Rodriguez-Valera 2004; Tringe et al. 2005). Elle consiste à cloner de longs fragments d'ADN extrait (40 à 250 kb), à cribler les banques de clones par exemple en recherchant un gène particulier, puis à séquencer les fragments sélectionnés qu'il est ensuite parfois possible d'attribuer à un partenaire (Teeling et al. 2004). L'information obtenue est très riche, et son analyse à l'aide des outils bioinformatiques permet d'éclairer davantage la physiologie des organismes dont proviennent ces séquences (López-García et al. 2004).

La compréhension de l'évolution des symbioses et de leur biogéographie bute également sur plusieurs difficultés. D'une part la répartition mondiale des différentes espèces est méconnue, et l'aperçu que l'on en a est fragmentaire. On ignore si des formes libres des bactéries symbiotiques existent, et sous quelle forme (actives ou quiescentes). Par ailleurs, très peu d'études en dehors de celles réalisées au cours de ce travail ont été consacrées aux mytilidés proches phylogénétiquement du groupe des *Bathymodiolus*. Enfin, si les marqueurs génétiques utilisés pour les hôtes ont une résolution convenable (Won et al. 2003; Miyazaki et al. 2004), l'ARNr 16S utilisé pour les phylogénies bactériennes est trop peu résolutif pour espérer décrypter les relations biogéographiques entre populations de symbiontes. L'emploi

de nouveaux marqueurs tels que l'ITS devrait améliorer la résolution des phylogénies de symbiotes (Hurtado et al. 2003; Won et al. 2003).

Enfin, diverses études tendent à montrer que les écosystèmes à base chimiosynthétique sont une composante non négligeable du cycle du carbone dans l'océan, et que la matière organique autochtone peut parfois être une source importante de carbone pour les animaux peuplant certaines régions comme le Golfe du Mexique (Olu-LeRoy et al. 2004). Comme nous l'avons montré au cours de cette étude, divers outils permettent d'avoir accès à la connaissance des caractéristiques physico-chimiques de ces environnements, de leur variabilité, et de leur influence qualitative et quantitative sur les communautés d'organismes, notamment symbiotiques, qui les peuplent. Quantifier l'importance de ces paramètres sur la productivité des environnements à base chimiosynthétique et établir des modèles prédictifs nécessitera l'amélioration des outils de mesure (notamment chimique), et l'établissement de structures 'observatoires' performantes et pérennes.

Bibliographie

- Abrajano TA, Murphy DE, Fang J, Comet P, Brooks JM (1994) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in individual fatty acids of marine mytilids with and without bacterial symbionts. *Org Geochem* 21(6/7): 611-617.
- Acinas AG, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Pharino C, Ceraj I et al. (2004) Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430: 551-554.
- Alain K, Zbinden M, Le Bris N, Lesongeur F, Querellou J et al. (2004) Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol* 6(3): 227-241.
- Alain K, Olagnon M, Desbruyères D, Page A, Barbier G et al. (2002) Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol* 42(3): 463-476.
- Aloisi G, Pierre C, Rouchy JM, Foucher JP, Woodside J (2004) Methane related authigenic carbonates of Eastern Mediterranean Sea mud volcanoes and their possible relation to gas hydrate destabilisation. *Earth Planet Sci Lett* 184(1): 321-338.
- Aloisi G, Bouloubassi I, Heijs S, Pancost RD, Pierre C et al. (2002) CH_4 -consuming microorganisms and the formation of carbonate crusts at cold seeps. *Earth Planet Sci Lett* 203: 195-203.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59(1): 143-169.
- Andersen A, Hourdez S, Marie B, Jollivet D, Lallier FH et al. (2004) *Escarpia southwardae* sp. nov., a new species of vestimentiferan tubeworm (Annelia, Siboglinidae) from West African cold seeps. *Can J Zool* 82: 980-999.
- Anderson AE (1995) Metabolic responses to sulfur in lucinid bivalve. *Am Zool* 35(121-131).
- Anderson AE, Childress JJ, Favuzzi JA (1987) Net uptake of CO_2 driven by sulfide and thiosulfate oxidation in the bacterial symbiont-containing clam *Solemya reidi*. *J Exp Biol* 133: 1-31.
- Anthony C (1982) *The biochemistry of methylotrophs*; Academic, editor. London.
- Arndt C, Gaill F, Felbeck H (2001) Anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. *Journal of Experimental Biology* 204: 741-750.
- Arvidson RS, Morse JW, Joye SB (2004) The sulfur biogeochemistry of chemosynthetic cold seep communities, gulf of Mexico, USA. *Marine Chemistry* 87: 97-119.
- Avendano-Herrera R, Rodriguez J, Magarinos B, ROmalde JL, Toranzo AE (2004) Intraspecific diversity of the marine fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *J Appl Microbiol* 96(4): 871-877.
- Azam F (2001) Introduction, history and overview: the methods to our madness. *Methods in Microbiology* 30: 1-12.
- Baco AR, Smith CR (2003) High species richness in deep-sea-chemoautotrophic whale skeleton communities. *Marine Ecology Progress Series* 260: 109-114.
- Bano N, Hollibaugh JT (2002) Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl Env Microbiol* 68(2): 505-518.
- Barry JP, Kochevar RE (1998) A tale of two clams: differing chemosynthetic life styles at cold seep communities in Monterey Bay. *Cah Biol Mar* 39: 329-331.
- Bayne BL (1976) *Marine mussels, their ecology and physiology*. London: Cambridge University Press.

- Belkin S, Nelson DC, Jannash HW (1986) Symbiotic assimilation of CO₂ in two hydrothermal vent animals, the mussel, *Bathymodiolus thermophilus*, and the tube worm *Riftia pachyptila*. Biol Bull 170(110).
- Berg CJ, Alatalo P (1984) Potential of chemosynthesis in molluscan mariculture. Aquaculture 39: 165-179.
- Bergquist DC, Fleckenstein C, Szalai EB, Knisel J, Fisher CR (2004) Environment drives physiological variability in the cold seep mussel *Bathymodiolus childressi*. Limnol Oceanogr 49(3): 706-715.
- Bernhard JM, Buck KR, Farmer MA, Bowser SS (2000) The Santa Barbara basin is a symbiosis oasis. Nature 403: 77-80.
- Bernhardt JM, Buck KR, Barry JP (2001) Monterey Bay cold seep biota: assemblages, abundance, and ultrastructure of living foraminifera. Deep-Sea Res Part I 48: 2233-2249.
- Blazejak A, Erseus C, Amann R, Dubilier N (2005) Coexistence of Bacterial Sulfide Oxidizers, Sulfate Reducers, and Spirochetes in a Gutless Worm (Oligochaeta) from the Peru Margin. Appl Environ Microbiol 71(3): 1553-1561.
- Boetius A (2005) Microfauna-macrofauna interaction in the seafloor: lessons from the tubeworm. PLoS Biology 3(3): 375-378.
- Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F et al. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. Nature 407: 623-626.
- Borowski WS, Paull CK, Ussler III W (1999) Global and local variations of interstitial sulfate gradients in deep-water, continental margin sediments: sensitivity to underlying methane and gas hydrates. Marine Geology 159: 131-154.
- Boschker HTS, Middelburg JJ (2002) Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. FEMS Microbiology Ecology 40: 85 - 95.
- Bourne DG, Holmes AJ, Iversen N, Murrell JC (2000) Fluorescent oligonucleotide rDNA probes for specific detection of methane oxidising bacteria. FEMS Microbiology Ecology 31: 29-38.
- Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM (2000) Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. Appl Environ Microbiol 66(5): 2096-2104.
- Bright M, Keckeis H, Fisher CR (2000) An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis. Mar Biol 136: 621-632.
- Brinkmeyer R, Knittel K, Jurgens J, Weyland H, Amann R et al. (2003) Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. Appl Environ Microbiol 69(11): 6610-6619.
- Brown KM, Westbrook GK (1988) Mud diapirism and subcretion in the Barbados ridge accretionary complex: the role of fluids in accretionary processes. Tectonics 7(3): 613-640.
- Brown MW, Schwalbach MS, Hewson I, Fuhrman JA (2005) Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and ARISA to show marine microbial diversity: development and application to a time series. Environ Microbiol In Press.
- Brusca RC, Brusca GJ (2003) Invertebrates. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Buchner A (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms; Interscience, editor. New York.
- Buck KR, Barry JP, Simpson AGB (2000) Monterey Bay cold seep biota: Euglenozoa with chemoautotrophic symbionts. Europ J Protistol 36: 117-126.

- Campbell BC, Jeanthon C, Kostka JE, Luther III GW, Cary SC (2001) Growth and phylogenetic properties of novel Bacteria belonging to the Epsilon subdivision of the *Proteobacteria* enriched from *Alvinella pompejana* and deep sea hydrothermal vents. *Appl Env Mic Oct.*: 4566 - 4572.
- Campbell BJ, Cary SC (2001) Characterization of a novel spirochete associated with the hydrothermal vent polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Env Microbiol* 67(1): 110-117.
- Campbell BJ, Stein JL, Cary SC (2003) Evidence of Chemolithoautotrophy in the Bacterial Community Associated with *Alvinella pompejana*, a Hydrothermal Vent Polychaete. *Appl Environ Microbiol* 69(9): 5070-5078.
- Carney RS (1994) Consideration of the oasis analogy for chemosynthetic communities at Gulf of Mexico hydrocarbon vents. *Geo-Marine Letters* 14: 149-159.
- Cary SC (1994) Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(3): 121-130.
- Cary SC, Fisher CR, Felbeck H (1988) Mussel growth supported by methane as sole carbon and energy source. *Science* 240: 78-80.
- Cary SC, Cottrell MT, Stein JL, Camachoe F, Desbruyères D (1997) Molecular identification and localization of filamentous symbiotic Bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Env Mic Mar.*: 1124 - 1130.
- Cavanaugh CM (1983) Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature* 302: 58-61.
- Cavanaugh CM (1993) Methanotroph-invertebrate associations: symbioses from deep sea cold seeps and hydrothermal vents. In: Guerrero R, Pedros-Alio C, editors. *Trends in Microbial Ecology: Spanish sSociety for Microbiology*. pp. 227-230.
- Cavanaugh CM, Wirsén CO, Jannasch HW (1992) Evidence for methylotrophic symbionts in a hydrothermal vent mussel (*Bivalvia: Mytilidae*) from the Mid-Atlantic Ridge. *Appl Env Microbiol* 58(12): 3799-3803.
- Cavanaugh CM, McKiness ZP, Newton ILG, Stewart FJ (2005) Marine chemosynthetic symbioses. In: Dworkin Mea, editor. *The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. New York: Springer-Verlag.
- Cavanaugh CM, Gardiner SL, Jones ML, Jannasch HW, Waterbury JB (1981) Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213: 340-342.
- Cavanaugh CM, Levering PR, Maki JS, Mitchell R, Lidstrom ME (1987) Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* 325(6102): 346-347.
- Charlou JL, Donval JP, Douville E, Jean-Baptiste P, Radford-Knoery J et al. (2000) Compared geochemical signatures and the evolution of Menez Gwen (37 degrees 50 ' N) and Lucky Strike (37 degrees 17 ' N) hydrothermal fluids, south of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge. *Chemical Geology* 171(1-2): 49-75.
- Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Ondréas H, Knoery J et al. (2004) Physical and chemical characterization of gas hydrates and associated methane plumes in the Congo-Angola Basin. *Chemical Geology* 205: 405-425.
- Chevaldonné P, Jollivet D, Vangriesheim A, Desbruyères D (1997) Hydrothermal-vent alvinellid polychaete dispersal in the eastern Pacific. 1. Influence of vent site distribution, bottom currents and biological patterns. *Limnol Oceanogr* 42(1): 67-70.
- Chevaldonné P, Fisher CR, Childress JJ, Desbruyères D, Jollivet D et al. (2000) Thermotolerance and the 'Pompeii worms'. *Mar Ecol Prog Ser* 208: 293-295.
- Childress JJ, Fisher CR, Favuzzi JA, Arp AJ, Oros DR (1993) The role of a zinc-based, serum-borne sulphide-binding component in the uptake and transport of dissolved

- sulphide by the chemoautotrophic symbiont containing clam *Calymene elongata*. *J Exp Biol* 179: 131-158.
- Childress JJ, Fisher CR, Brooks JM, Kennicutt II MC, Bidigare R et al. (1986) A methanotrophic marine molluscan (*Bivalvia*, *Mytilidae*) symbiosis: Mussels fueled by gas. *Science* 233: 1306-1308.
- Chistoserdova L, Vorholt JA, Thauer RK, Lidstrom ME (1998) C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea. *Science* 281: 99-102.
- Cleveland LR, Grimstone AV (1964) The fine structure of the flagellate *Mixotricha paradoxa* and its associated microorganisms. *Proc Roy Soc of London* 159: 668-686.
- Colaco A, Dehairs F, Desbruyères D, Le Bris N, Sarradin PM (2002) $\delta^{13}\text{C}$ signature of hydrothermal mussels is related with the end-member fluid concentration of H_2S and CH_4 at the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Cah Biol Mar* 43: 259-262.
- Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q et al. (2003) The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31(1): 442-443.
- Compère P, Martinez AS, Chearmantier-Daures M, Toullec JY, Goffinet G et al. (2002) Does sulphide detoxication occur in the gills of the hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*? *C R Acad Sci III-Vie* 325: 591-596.
- Comtet T, Desbruyères D (1998) Population structure and recruitment in mytilid bivalves from the Lucky Strike and Menez Gwen hydrothermal vent fields (37°17'N and 37°50'N on the Mid-Atlantic Ridge). *Marine Ecology Progress Series* 163: 165-177.
- Comtet T, Le Pennec M, Desbruyères D (1999) Evidence of a sexual pause in *Bathymodiolus azoricus* (*Bivalvia*: *Mytilidae*) from hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of Marine Biological Association of UK* 79: 1149-1150.
- Cordes EE, Arthur MA, Shea K, Arvidson RS, Fisher CR (2005) Modeling the mutualistic interactions between tubeworms and microbial consortia. *PLoS Biology* 3(3): 497-506.
- Cottrell MT, Cary SC (1999) Diversity of dissimilatory bisulfite reductase genes of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Env Microbiol* 65: 1127-1132.
- Council NR (1979) Hydrogen sulfide; Division of medical science sohs, editor. Baltimore: University Park Press.
- Craddock C, Hoeh WR, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1995) Extensive gene flow among mytilids (*Bathymodiolus thermophilus*) populations from hydrothermal vents of the Eastern Pacific. *Mar Biol* 124: 137-146.
- Craddock C, Hoeh WR, Gustafson RG, Lutz RA, Hashimoto J et al. (1995) Evolutionary relationships among deep-sea mytilids (*Bivalvia*: *Mytilidae*) from hydrothermal vents and cold water methane/sulfide seeps. *Mar Biol* 121: 477 - 485.
- Dalsgaard T, Thamdrup B, Canfield DE (2005) Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology* 156: 457-464.
- Dattagupta S, Bergquist DC, Szalai EB, Macko SA, Fisher CR (2004) Tissue carbon, nitrogen and sulfur stable isotope turnover in transplanted *Bathymodiolus childressii* mussels: relation to growth and physiological condition. *Limnol Oceanogr* 49(4): 1144-1151.
- De Bary A (1879) Die Erscheinung der Symbiose. *Naturforschung Versammlung Cassel*: 121.
- Delwiche CF, Palmer JD (1996) Rampant horizontal transfer and duplication of RubisCO genes in eubacteria and plastids. *Mol Biol Evol* 13: 873-882.
- Deming JW, Reysenbach AL, Macko SA, Smith CR (1997) Evidence for the microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor:

- bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. *Miscrosc Res Tech* 37(2): 162-170.
- Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, McCracken VJ, Aminov R et al. (2000) Molecular Ecological Analysis of the Succession and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in the Mouse Gastrointestinal Tract. *Appl Environ Microbiol* 66(5): 2166-2174.
- Desbruyères D, Almeida A, Biscoito M, Comtet T, Khripounoff A et al. (2000) A review of the distribution of hydrothermal vent communities along the northern Mid-Atlantic Ridge: dispersal vs. environmental controls. *Hydrobiologia* 440: 201-216.
- Desbruyères D, Biscoito M, Caprais JC, Colaço A, Comtet T et al. (2001) Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep-Sea Res I* 48: 1325-1346.
- Desbruyères D, Chevalloné P, Alayse AM, Jollivet D, Lallier FH et al. (1998) Biology and ecology of the "Pompeii worm" (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: A synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-Sea Res Part II* 45: 383-422.
- Di Meo-Savoie C, Luther III GW, Cary SC (2004) Physicochemical characterization of the microhabitat of the epibionts associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent annelid. *Geochim Cosmochim Acta* 68(9): 2055-2066.
- Di Meo C, Wilbur AE, Holben WE, Feldman RA, Vrijenhoek RC et al. (2000) Genetic variation among endosymbionts of widely distributed vestimentiferan tubeworms. *Appl Env Mic Feb.*: 651 - 658.
- Distel D, Baco A, Chuang E, Morrill W, Cavanaugh C et al. (2000) Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? *Nature* 403(6771): 725-726.
- Distel D, Lane D, Olsen G, Giovannoni S, Pace B et al. (1988) Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts - Analysis of phylogeny and specificity by 16S ribosomal RNA sequences. *J Bacteriol* 170(6): 2506 - 2510.
- Distel DL (2000) Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggests convergence in Mytilid body plans. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15(1): 25-33.
- Distel DL, Wood AP (1992) Characterization of the gill symbiont of *Thyasira flexuosa* (Thyasiridae: Bivalvia) by use of the polymerase chain reaction and 16S rRNA sequence analysis. *J Bacteriol* 174: 6317-6320.
- Distel DL, Cavanaugh CM (1994) Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *Journal of Bacteriology* 176(7): 1932-1938.
- Distel DL, Lee HKW, Cavanaugh CM (1995) Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9598-9602.
- Distel DL, Beaudoin DJ, Morrill W (2002) Coexistence of multiple proteobacterial endosymbionts in the gills of the wood-boring bivalve *Lyrodus pedicellatus* (Bivalvia: Teredinidae). *Appl and Env Microbiol*: 6292 - 6299.
- Doolittle WF (1999) Lateral genomics. *Trends Cell Biol* 9: 5-8.
- Dubilier N (2004) Multiple bacterial endosymbionts in gutless marine worms: competitors or partners? *Nova Acta Leopoldina* 333: 107-112.
- Dubilier N, Windoffer R, Giere O (1998) Ultrastructure and stable carbon isotope composition of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus brevior* and *B.sp. affinis brevior* from the North Fiji Basin, western Pacific. *Mar Ecol Prog Ser* 165: 187-193.
- Dubilier N, Giere O, Distel DL, Cavanaugh CM (1995) Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (Oligochaeta, Annelida) by phylogenetic

- 16 rRNA sequence analysis and in situ hybridization. *Appl Env Microbiol* (June): 2346 - 2350.
- Dubilier N, Mülders C, Felderman T, De Beer D, Pernthaler A et al. (2001) Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing in an oligochaete worm. *Nature* 411: 298-302.
- Dubilier N, Amann R, Erseus C, Muyzer G, Park Sue Y et al. (1999) Phylogenetic diversity of bacterial endosymbionts in the gutless oligochaete *Olavius loisae* (Annelida). *Mar Ecol Prog Ser* 178: 271-280.
- Dufour SC, Felbeck H (2003) Sulphide mining by the superextensible foot of symbiotic thyasirid bivalves. *Nature* 426: 65-67.
- Dunlap PV, Ast JC (2005) Genomic and phylogenetic characterization of luminous Bacteria symbiotic with the deep-sea fish *Chlorophthalmus albatrossii* (Aulopiformes: Chlorophthalmidae). *Appl Env Microbiol* 71(2): 930-939.
- Duperron S, Nadalig T, Caprais JC, Sibuet M, Fiala-Médioni A et al. (2005) Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (South East Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in the gills. *Appl Env Microbiol* 71(4): 1694-1700.
- Duplessis MR, Ziebis W, Gros O, Caro A, Robidart J et al. (2004) Respiration strategies utilized by the gill endosymbiont from the host lucinid *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Appl Env Microbiol* 70(7): 4144-4150.
- Durand P, Gros O (1996) Bacterial host specificity of Lucinacea endosymbionts: interspecific variation in 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiology Letters* 140: 193-198.
- Durand P, Gros O, Frenkiel L, Prieur D (1996) Phylogenetic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three tropical Lucinidae by 16S rDNA sequence analysis. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5(1): 37-42.
- Eisen JA, Smith SW, Cavanaugh CM (1992) Phylogenetic relationships of chemoautotrophic bacterial symbionts of *Solemya velum* Say (Mollusca: Bivalvia) determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *J Bacteriol* 174: 3416-3421.
- Elderfield H, Schulz A (1996) Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean. *Annu Rev Earth Planet Sci* 24: 191-224.
- Elsaied HE, Naganuma T (2001) Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit genes from deep-sea microorganisms. *Appl Env Microbiol* 67(4): 1751-1765.
- Elsaied HE, Hayashi T, Naganuma T (2005) Molecular Analysis of Deep-Sea Hydrothermal Vent Aerobic Methanotrophs by Targeting Genes of 16S rRNA and Particulate Methane Monooxygenase. *Marine Biotechnology* 6(5): 503-509.
- Emerson D, Moyer CL (2002) Neutrophilic Fe-oxidizing Bacteria are abundant at the Loihi Seamount Hydrothermal Vents and play a major role in Fe oxide deposition. *Appl Env Microbiology* June: 3085 - 3093.
- Endow K, Ohta S (1990) Occurrence of bacteria in the primary oocytes of vesicomyid clam *Calyptogena soyoe*. *Mar Ecol Prog Ser* 64: 309-317.
- Felbeck H, Childress JJ, Somero GN (1981) Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* 293: 291.
- Felbeck H, Liebezeit G, Dawson R, Giere O (1983) CO₂ fixation in tissues of marine oligochaetes (*Phallodrilus leukodermatus* and *P. planus*) containing symbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Mar Biol* 75: 187-191.
- Feldman RA, Black MB, Cary SC, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1997) Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6: 268-277.
- Felsenstein J (2004) *Inferring phylogenies*. Sunderland, MA: Sinauer. 664 p.

- Fenchel T (2003) Biogeography for Bacteria. *Science* 301: 925-926.
- Fiala-Médioni A (1984) Mise en évidence par microscopie électronique à transmission de l'abondance de bactéries symbiotiques dans la branchie de Mollusques bivalves de sources hydrothermales profondes. *C R Hebd Séances Acad Sci* 298(17): 487-492.
- Fiala-Médioni A, Alayse AM, Cahet G (1986) Evidence of *in situ* uptake and incorporation of bicarbonate and amino-acids by a hydrothermal vent mussel. *J Exp Mar Biol Ecol* 96: 191-198.
- Fiala-Médioni A, Métivier C, Herry A, Le Pennec M (1986) Ultrastructure of the gill filament of an hydrothermal vent mytilid *Bathymodiolus sp.* *Mar Biol* 92(1): 65-72.
- Fiala-Médioni A, Felbeck H, Childress JJ, Fisher CR, Vetter RD (1990) Lysosomal resorption of bacterial endosymbionts in deep-sea bivalves. In: Nardon P, Gianinazzi-Pearson V, Grenier AM, Margulis L, Smith DC, editors. *Endocytobiology IV*. Villeurbanne (France): INSA. pp. 335-338.
- Fiala-Médioni A, Boulègue J, Otha S, Felbeck H, Mariotti A (1993) Source of energy sustaining the Calyptogena populations from deep trenches in subduction zones off Japan. *Deep-Sea Res* 40(6): 1241-1258.
- Fiala-Médioni A, MvKiness ZP, Dando P, Boulegue J, Mariotti A et al. (2002) Ultrastructural, biochemical and immunological characterisation 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 (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev Aquat Sci* 2: 399-613.
- Fisher CR, Childress JJ (1992) Organic carbon transfer from methanotrophic symbionts to the host hydrocarbon-seep mussel. *Symbiosis* 12: 221-235.
- Fisher CR, Childress JJ, Oremland RS, Bidigare RR (1987) The importance of methane and thiosulphate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Mar Biol* 96: 59-71.
- Fisher CR, Urcuyo I, Simpkins MA, Nix E (1997) Life in the slow lane: growth and longevity of cold-seep vestimentiferans. *Mar Ecol* 18: 83-94.
- Fisher CR, Brooks JM, Vodenichar JS, Zande JM, Childress JJ et al. (1993) The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur oxydizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *P S Z N I: Mar Ecol*.
- Fisher CR, Childress JJ, Arp AJ, Brooks JM, Distel DL et al. (1988) Microhabitat variation in the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*, at the Rose Garden vent on the Galapagos Rift. *Deep-Sea Res* 35(10/11): 1769-1791.
- Flores JF, Fisher CR, Carney SL, Green BN, Freytag JK et al. (2005) Sulfide binding is mediated by zinc ions discovered in the crystal structure of a hydrothermal vent tubeworm hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(8): 2713-2718.
- Fornari DJ, Embley RW (1995) Tectonic and volcanic controls on hydrothermal processes at the Mid-Ocean ridge: an overview based on near-bottom and submersible studies. In: Humphris SE, Zierenberg RA, Mullineaux LS, Thomson RE, editors. *Seafloor hydrothermal systems: physical, chemical, biological and geological interactions* Geophys Monogr Am Geophys Union. pp. 1-46.
- Frette L, Jorgensen NO, Irming H, Kroer N (2004) *Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(2): 519-524.
- Freytag JK, Girguis PR, Bergquist DC, Andras JP, Childress JJ et al. (2001) A paradox resolved: sulfide acquisition by roots of seep tubeworms sustains net chemoautotrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(23): 13408-13413.

- Friedman S, de Ley J (1965) "Genetic Species" concept in *Xanthomonas*. J Bacteriol 89(1): 95-100.
- Fujiwara Y, Kato C, Masui N, Fujikura K, Kojima S (2001) Dual symbiosis in the cold-seep thyasirid clam *Maorithyas hadalis* from the hadal zone in the Japan Trench, western Pacific. Mar Ecol Prog Ser 214: 151-159.
- Fujiwara Y, Takai K, Uematsu K, Tsuchida S, Hunt JC et al. (2000) Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distribution. Mar Ecol Prog Ser 208: 147-155.
- Gage JD, Tyler PA (1991) Deep-sea biology: A natural history of organisms at the deep-sea floor: Cambridge University Press. 503 p.
- Galchenko VF, Pimenov NV, Lein AY, Galkin SV, Miller YM et al. (1992) Mixotrophic type of feeding of *Olgaconcha tufari* (Gastropoda: Prosobranchia) from the active hydrothermal field of the Manus Basin (Bismak Sea). Dokl Biol Sci 323: 125-129.
- Garrity GM, Boone DR (2001-2005) Bergey's manual of systematic bacteriology.
- Gebruk AV, Chevaldonné T, Shank T, Lutz RA, Vrijenhoek RC (2000) Deep-sea hydrothermal vent communities of the Logatchev area (14°45'N, Mid-Atlantic Ridge): diverse biotopes and high biomass. J Mar Biol Ass UK 80: 383-393.
- Geret F, Rousse N, Riso R, Sarradin PM, Cosson R (1998) Metal compartmentalization and metallothionein isoforms in mussels from the Mid-Atlantic Ridge; preliminary approach to the fluid-organism relationship. Cah Biol Mar 39(291-293).
- Giere O (1985) The gutless marine tubificid *Phallogdrilus planus*, a flattened oligochaete with symbiotic bacteria - results from morphological and ecological studies. Zoologica Scripta 14(4): 279-286.
- Gil R, Latorre A, Moya A (2004) Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. Environ Microbiol 6(11): 1109-1122.
- Gil R, Silva FJ, Zientz E, Delmotte F, Gonzalez-Candelas F et al. (2002) Extreme genome reduction in *Buchnera* spp. toward the minimal genome needed for symbiotic life. Proc Natl Acad Sci USA 99: 4454-4458.
- Goffredi SK, Barry JP (2002) Species-specific variation in sulfide physiology between closely related Vesicomid clams. Mar Eco Prog Ser 225: 227-238.
- Goffredi SK, Warén A, Orphan VJ, Van Dover CL, Vrijenhoek RC (2004) Novel forms of structural integration between microbes and a hydrothermal vent gastropod from the Indian ocean. Appl Env Microbiol May: 3082-3090.
- Goffredi SK, Orphan VJ, Rouse GW, Jahnke L, Embaye T et al. (2005) Evolutionary innovation: a bone-eating marine symbiosis. Environ Microbiol 7(9): 1369-1378.
- Goodson MS, Whitehead LF, Douglas AE (2001) Symbiotic dinoflagellates in marine Cnidaria: diversity and function. Hydrobiologia 461: 79 - 82.
- Goreau TF (1959) The physiology of skeleton formation in corals. I. A method for measuring the rate of calcium deposition by corals under different conditions. Biol Bull 116: 59-75.
- Gosink JJ, Woese CR, Staley JT (1998) *Polaribacter* gen. nov. with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides groups and reclassification of '*Flectobacillus glomeratus*' as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 48: 223-235.
- Grassle JF, Maciolek NJ (1992) Deep sea species richness: regional and local diversity estimates from quantitative bottom samples. Am Nat 139: 313-341.
- Grassle JP (1985) Genetic differentiation in populations of hydrothermal vent mussels (*Bathymodiulus thermophilus*) from the Galapagos Rift and 13°N on the East Pacific Rise. Bull Biol Soc of Washington 6: 429-442.

- Gros O, Liberge M, Felbeck H (2003) Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Mar Biol* 142: 57-66.
- Gros O, Darrasse A, Durand P, Frenkiel L, Mouëza M (1996) Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. *Appl Env Microbiol* 62: 2324-2330.
- Gros O, Liberge M, Heddi A, Kherchadourian C, Felbeck H (2003) Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (*Thalassia testudinum* environment). *Appl Env Microbiol* Oct.: 6254-6257.
- Gustafson R, Turner R, Lutz R, Vrijenhoek R (1998) A new genus and five new species of mussels (Bivalvia, Mytilidae) from deep-sea sulfide/hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico. *Malacologia* 40(1-2): 63-112.
- Gustafson RG, Reid RGB (1988) Association of bacteria with larvae of the gutless protobranch bivalve *Solemya reidi* (Cryptodonta: Solemyidae). *Mar Biol* 97: 389-401.
- Gutell RR, Lee JC, Cannone JJ (2002) The accuracy of ribosomal RNA comparative structure models. *Curr Op Struct Biol* 12: 301-310.
- Hashimoto J (2001) A new species of *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vent communities in the Indian Ocean. *Venus* 60(3): 141-149.
- Hashimoto J, Okutani T (1994) Four new mytilid mussels associated with deepsea chemosynthetic communities around Japan. *Venus* 53(2): 61 - 83.
- Hashimoto J, Ohta S, Tanaka T, Hotta H, Matsuzawa S et al. (1989) Deep-sea communities dominated by the giant clam, *Calyptogena soyae*, along the slope foot of Hatsushima Island, Sagami Bay, Central Japan. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 71: 179-192.
- Hayes JM (1993) Factors controlling ¹³C content of sedimentary organic compounds: principles and evidence. *Mar Geol* 113: 111 - 125.
- Hayes JM (2001) Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic pathways. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 43: 225 - 277.
- Hecker B (1985) Fauna from a cold sulfur-seep in the Gulf of Mexico: comparison with hydrothermal vent communities and evolutionary implications. *Biol Bull Soc Wash* 6: 465-474.
- Helly JJ, Levin LA (2004) Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep-Sea Res Part I* 51: 1159-1168.
- Henry P, Bourlange S (2004) Smectite and fluid budget at Nankai ODP sites derived from cation exchange capacity. *Earth Planet Sci Lett* 219(1-2): 129-145.
- Henry P, Le Pichon X, Lallemand SJ, Foucher JP, Westbrook GK et al. (1990) Mud volcano field seaward of the Barbados accretionary complex: a deep-towed side scan sonar survey. *Jour Geophys Res* 95: 8917-8929.
- Hentschel U, Felbeck H (1995) Nitrate respiration in chemoautotrophic symbionts of the bivalve *Lucinoma aequizonata* is not regulated by oxygen. *Appl Env Microbiol* 61: 1630-1633.
- Herring P (2001) *The biology of the deep ocean*; Press OU, editor. Oxford, UK. 324 p.
- Hessler R, Sander HL (1967) Faunal diversity in the deep sea. *Deep-Sea Res* 14: 65-78.
- Hoffmeister M, Martin W (2003) Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environmental Microbiology* 5(8): 641-649.
- Huguen C, Masclé J, Chaumillon E, Kopf A, Woodside J et al. (2004) Structural setting and tectonic control of mud volcanoes from the Central Mediterranean Ridge (eastern Mediterranean). *Mar Geol* 209(1-4): 245.

- Hurtado LA, Mateos M, Lutz RA, Vrijenhoek RC (2003) Coupling of bacterial endosymbiont and host mitochondrial genome in the hydrothermal vent clam *Calymene magnifica*. *Appl Env Microbiol* 69(4): 2058-2064.
- Itoh T, Martin W, Nei M (2002) Acceleration of genomic evolution caused by enhanced mutation rate in endocellular symbionts. *PNAS* 99(20): 12944-12948.
- Jahnke LL, Summons RE, Dowling LM, Zahiralis KD (1995) Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold seep mussel gills: chemical and isotopic analysis. *Appl Env Microbiol*: 576 - 582.
- Jannasch HW, Nelson DC (1984) Recent progress in the microbiology of hydrothermal vents. In: Klug MJ, Reddy CA, editors. *Current perspectives in microbial ecology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. pp. 170-175.
- Jannasch HW, Mottl MJ (1985) Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* 229: 717-725.
- Janvier M, Grimont P (1995) The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch Gamma of Proteobacteria. *Res Microbiol* 146(7): 543-550.
- Jeanthon C, Prieur D (1990) Susceptibility to heavy metals and characterization of heterotrophic bacteria isolated from two hydrothermal vent polychaete annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*. *Appl Env Microbiol* 56: 1679-1687.
- Jobb G (2003) TREEFINDER version March 2003. Munich, Germany Distributed by the author at www.treefinder.de.
- Johnson KS, Beehler CL, Sakamoto-Arnold CM, Childress JJ (1986) *In situ* measurements of chemical distributions in a deep-sea hydrothermal vent field. *Science* 231: 1139-1141.
- Johnson KS, Childress JJ, Beehler CL, Sakamoto CM (1994) Biogeochemistry of hydrothermal vent mussel communities - the deep-sea analog to the intertidal zone. *Deep-Sea Research part I* 41(7): 993-1011.
- Jollivet D, cruise spotS (1989) Premières observations de communautés animales associées à l'hydrothermalisme arrière-arc du bassin nord-Fidjien. *C R Acad Sci Paris* 309: 301-308.
- Jollivet D, Chevaldonné P, Planque B (1999) Hydrothermal-vent alvinellid polychaete dispersal in the eastern Pacific. 2. A metapopulation model based on habitats shifts. *Evolution* 53(4): 1128-1142.
- Jollivet D, Comtet T, Chevaldonné P, Hourdez S, Desbruyères D et al. (1998) Unexpected relationship between dispersal strategies and speciation within the association *Bathymodiolus* (Bivalvia) Branchiopolynoe (Polychaeta) inferred from the rDNA neutral ITS2 marker. *Cah Biol Mar* 39: 359-362.
- Joyner JL, Peyer SM, Lee RW (2003) Possible roles of sulfur-containing amino acids in a chemoautotrophic bacterium-mollusc symbiosis. *Biol Bull* 205: 331-338.
- Julian D, Gaill F, Wood E, Arp AJ, Fisher CR (1999) Roots as a site of hydrogen sulfide uptake in the hydrocarbon seep vestimentiferan *Lamellibrachia* sp. *J Exper Biol* 202: 2245-2257.
- Juniper KS, Sibuet M (1987) Cold seep benthic communities in Japan subduction zones: spatial organisation, trophic strategies and evidence for temporal evolution. *Mar Ecol Prog Ser* 40: 115 - 126.
- Kadar E, Bettencourt R, Costa V, Serrão Santos R, Lodo-da-Cunha A et al. (2005) Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *J Exp Mar Bio Ecol* 318: 99-110.
- Kenk VC, Wilson BR (1985) A new mussel (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents in the Galapagos Rift zone. *Malacologia* 26(1-2): 253-271.

- Kimura H, Higashide Y, Naganuma T (2003) Endosymbiotic Microflora of the Vestimentiferan tubeworm (*Lamellibrachia* sp.) from a Bathyal Cold Seep. *Mar Biotechnol* Sep 25.
- Kimura H, Sato M, Sasayama Y, Naganuma T (2003) Molecular Characterization and *In Situ* Localization of Endosymbiotic 16S Ribosomal RNA and RuBisCO Genes in the Pogonophoran Tissue. *Mar Biotechnol* 5(3): 261-269.
- Knittel K, Lösekann T, Boetius A, R. K, Amann R (2005) Diversity and distribution of methanotrophic Archaea at cold seeps. *Appl Env Microbiol* 71(1): 467-479.
- Kochevar RE, Childress JJ, Fisher CR, Minnich E (1992) The methane mussel: roles of symbiont and host in the metabolic utilization of methane. *Mar Biol* 112: 389-401.
- Kojima S, Segawa R, Fujiwara Y, Fujikura K, Ohta S et al. (2001) Phylogeny of hydrothermal vent endemic gastropods *Alviniconcha* spp. from the Western Pacific revealed by mitochondrial DNA sequences. *Biol Bull* 200: 298-304.
- Krieger J, Giere O, Dubilier N (2000) Localisation of RubisCO and sulfur in endosymbiotic bacteria of the gutless marine oligochaete *Inanidrilus lukodermatus* (Annelida). *Mar Biol* 137: 239 - 244.
- Krueger DM, Cavanaugh CM (1997) Phylogenetic diversity of bacterial symbionts of *Solemya* hosts based on comparative sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Env Microbiol* 63(1): 91-98.
- Kvenvolden KA (1999) Potential effects of gas hydrates on human welfare. *PNAS* 96(7): 3420-3426.
- LaMontagne MG, Leifer I, Bergmann S, Van De Werfhorst LC, Holden PA (2004) Bacterial diversity in marine hydrocarbon seep sediments. *Environ Microbiol* 6(8): 799-808.
- Lanoil BD, Sassen R, La Duc MT, Sweet ST, Neilson KH (2001) *Bacteria* and *Archaea* physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Appl Env Microbiol* 67(11): 5143-5153.
- Larsen EH, Quérel CR, Munoz R, Fiala-Medioni A, Donard OFX (1997) Arsenic speciation in shrimp and mussel from the Mid Atlantic hydrothermal vents. *Mar Chem* 57: 341 - 346.
- Le Bris N, Sarradin PM, Pennec S (2001) A new deep-sea probe for in situ pH measurement in the environment of hydrothermal vent biological communities. *Deep-Sea Res I* 48: 1941-1951.
- Le Bris N, Sarradin PM, Caprais JC (2003) Contrasted sulphide chemistries in the environment of 13°N EPR vent fauna. *Deep-Sea Res I* 50: 737-747.
- Le Bris N, Zbinden M, Gaill F (2005) Processes controlling the physico-chemical micro-environments associated with Pompeii worms. *Deep-Sea Res Part I* 52(6): 1071-1083.
- Le Pennec M, Beninger PG (2000) Reproductive characteristics and strategies of reducing-system bivalves. *Comp Bioch and Physiol Part A* 126: 1 - 16.
- Le Pichon X, Lallemand SJ, Fournier M, Cadet JP, Kobayashi A (1994) Shear partitioning in the eastern Nankai trough: evidence from submersible dives. *Earth Planet Sci Lett* 128: 77-83.
- Le Pichon X, Foucher JP, Boulègue J, Henry P, Lallemand SJ et al. (1990) Mud volcano field seaward of the Barbados accretionary complex: a submersible survey. *Jour Geophys Res* 95: 8931-8943.
- Lee RW, Childress JJ (1994) Assimilation of inorganic nitrogen by marine invertebrates and their chemoautotrophic symbionts. *Appl Environ Microbiol* 60(6): 1852-1858.
- Lee RW, Robinson JJ, Cavanaugh CM (1999) Pathways of inorganic nitrogen assimilation in chemoautotrophic bacteria-marine invertebrate symbioses: expression of host and symbiont glutamine synthetase. *J Exp Biol* 202: 289-300.

- Lerat E, Daubin V, Ochman H, Moran NA (2005) Evolutionary origins of genomic repertoires in Bacteria. *PLoS Biology* 3(5): 807-814.
- Levin LA, Ziebis W, Mendoza GF, Growney VA, Tryon MD et al. (2003) Spatial heterogeneity of macrofauna at northern California methane seeps: influence of sulfide concentration and fluid flow. *Mar Ecol Prog Ser* 265: 123-139.
- Lilley MD, de Angelis MA, Gordon LI (1982) CH₄, H₂, CO₂ and N₂O in submarine hydrothermal vent waters. *Nature* 300: 48-50.
- Little CTS, Vrijenhoek RC (2003) Are hydrothermal vent animals living fossils? *TREE* 18(11): 582-588.
- Lonsdale P (1977) Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep-Sea Res* 24: 857-863.
- Lonsdale P (1977) Deep-Tow observations at mounds abyssal hydrothermal field, Galapagos rift. *Earth Planet Sci Lett* 36(1): 92-110.
- Lonsdale P, Becker K (1985) Hydrothermal plumes, hot springs and conductive heat flow in the southern through of Guaymas Basin. *Earth Planet Sci Lett* 73: 211-225.
- López-García P, Philippe H, Gaill F, Moreira D (2003) Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid Atlantic Ridge. *PNAS* 100(2).
- Lòpez-García P, Gaill F, Moreira D (2002) Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Appl Env Microbiology* 4(4): 204 - 215.
- López-García P, Brochier C, Moreira D, Rodriguez-Valera F (2004) Comparative analysis of a genome fragment of an uncultivated mesopelagic crenarchaeote reveals multiple horizontal gene transfers. *Environ Microbiol* 6: 19-34.
- López-García P, Duperron S, Philippot P, Foriel J, Susini J et al. (2003) Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* 5(10): 961-976.
- Lutz RA, Jablonski D, Rhoads DC, Turner R (1980) Larval dispersal of a deep-sea hydrothermal vent bivalve from the Galapagos rift. *Mar Biol* 57: 127-133.
- Maas PAY, O'Mullan GD, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1999) Genetic and morphometric characterization of mussels (*Bivalvia*: Mytilidae) from Mid-Atlantic hydrothermal vents. *Biol Bull* 196: 265-272.
- MacAvoy SE, Macko SA, Joye SB (2002) Fatty acid carbon isotope signatures in chemosynthetic mussels and tubeworms from Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities. *Chem Geol* 185: 1-8.
- MacDonald I (1998) Habitat formation at Gulf of Mexico hydrocarbon seeps. *Cah Biol Mar* 39: 337 - 340.
- MacDonald IR, Sager WW, Peccini MB (2003) Association of gas hydrate and chemosynthetic fauna in mounded bathymetry at mid-slope hydrocarbon seeps: northern Gulf of Mexico. *Mar Geol* 198: 133-158.
- MacDonald IR, Boland GS, Baker JS, Brooks JM, Kennicutt II MC et al. (1989) Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities II. Spatial distribution of seep organisms and hydrocarbons at Bush Hill. *Mar Biol* 101: 235-247.
- MacDonald IR, Guinasso NL, Jr., Reilly JF, Brooks JM, Callender WR et al. (1990) Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities: VI. Patterns in community structure and habitat. *Geo-Marine Letters* 10: 244-252.
- MacDonald IR, Reilly II JF, Guinasso NL, Jr., Brooks JM, Carney RS et al. (1990) Chemosynthetic mussels at a brine-filled pockmark in the northern Gulf of Mexico. *Science* 248: 1096-1099.
- MacGregor BJ, Brüchert V, Fleischer S, Amann R (2002) Isolation of small-subunit rRNA for stable isotopic characterization. *Environ Microbiol* 4(8): 451-464.

- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2002) Brock Biology of Microorganisms: Pearson Education. 1018 p.
- Margulis L, Fester R (1991) Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis: MIT Press. 470 p.
- Marques A, Porteiro F (2000) Hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus* sp. (Mollusca: Mytilidae): Diet item of *Hydrolagus affinis* (Pisces: Chimaeridae). Copeia 3: 806-807.
- Marsh AG, Mullineaux LS, Young CM, Manahan DT (2001) Larval dispersal potential of the tubeworm *Riftia pachyptila* at deep-sea hydrothermal vents. Nature 411: 77-80.
- Martoja M (1995) Mollusques. Paris: Institut Océanographique.
- Mc Fall-Ngai MJ (2000) Negotiations between animal and bacteria: the 'diplomacy' of the squid-vibrio symbiosis. Comp Bioch and Physiol Part A 126: 471 - 480.
- McKiness ZP, Cavanaugh CM (2005) The ubiquitous mussel: *Bathymodiolus* aff. *brevior* symbiosis at the Central Indian Ridge hydrothermal vents. Mar Ecol Prog Ser 295: 183-190.
- McMullin ER, Hourdez S, Schaeffer SW, Fisher CR (2003) Phylogeny and biogeography of deep-sea vestimentiferan tubeworms and their bacterial endosymbionts. Symbiosis 34: 1-41.
- MEDINAUT/MEDINETH shipboard scientific parties (2000) Linking Mediterranean brine pools and mud volcanism. EOS 625-632.
- Mehta MP, Butterfield DA, Baross JA (2003) Phylogenetic Diversity of Nitrogenase (nifH) Genes in Deep-Sea and Hydrothermal Vent Environments of the Juan de Fuca Ridge. Appl Environ Microbiol 69(2): 960-970.
- Mills HJ, Martinez RJ, Story S, Sobecky PA (2005) Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries. Appl Env Microbiol 71(6): 3235-3247.
- Minic Z, Hervé G (2004) Biochemical and enzymological aspects of the symbiosis between the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont. Eur J Biochem 271: 3093-3102.
- Miyazaki JI, Shintaku M, Kyuno A, Fujiwara Y, Hashimoto J et al. (2004) Phylogenetic relationships of deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae). Mar Biol 144(3): 527.
- Monfort P, Baleux B (1999) Bactéries viables non cultivables: réalité et conséquences. Bulletin de la Société Française de Microbiologie 14(3): 201-207.
- Moraga D, Jollivet D, Denis F (1994) Genetic differentiation across the western Pacific populations of the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus* spp. and the eastern Pacific (13°N) population of *Bathymodiolus thermophilus*. Deep-Sea Research I 41(10): 1551 - 1567.
- Moran NA, Baumann P (2000) Bacterial endosymbionts in animals. Curr Op Microbiol 3: 270-275.
- Morita RY (2000) Is H₂ the universal energy source for long-term survival. Microbial Ecol 38: 307-320.
- Nealson KH (1997) Sediment bacteria: who's there, what are they doing, and what's new? Ann Rev Earth Planet Sci 25: 403-434.
- Nelson DC (1998) Recent progress in the microbiology of deep-sea hydrothermal vents and seeps. Cahiers-De-Biologie-Marine 39(3-4): 373-378.
- Nelson DC, Fisher CR (1995) Chemoautotrophic and methanotrophic endosymbiotic bacteria at deep-sea vents and seeps. In: Karl DM, editor. Microbiology of deep-sea hydrothermal vents. Boca Raton, FL: CRC Press inc. pp. 125-167.

- Nelson DC, Hagen KD, Edwards DB (1995) The gill symbionts of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* is a psychrophilic, chemoautotrophic, sulfur bacterium. *Marine Biology* 121: 487-495.
- Nishiguchi MK, Ruby EG, McFall-Ngai MJ (1998) Competitive dominance among strains of luminous bacteria provides an unusual form of evidence for parallel evolution in Sepiolid-squid *Vibrio* symbioses. *Appl Env Microbiol* 64(9): 3209-3213.
- Olu-LeRoy K, Sibuet M, Fiala-Médioni A, Gofas S, Salas C et al. (2004) Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: composition, symbiosis, and spatial distribution on mud volcanoes. *Deep-Sea Res I* 51: 1915-1936.
- Olu K, Duperret A, Sibuet M, Foucher JP, Fiala-Médioni A (1996) Structure and distribution of cold-seep communities along the Peruvian active margin: relationship to geological and fluid patterns. *Mar Ecol Prog Ser* 132: 109-125.
- Olu K, Sibuet M, Hermeignies F, Foucher J-P, Fiala-Médioni A (1996) Spatial distribution of diverse cold seep communities living on various diapiric structures of the southern Barbados prism. *Prog Oceanog* 38: 347 - 376.
- Olu K, Lance S, Sibuet M, Henry P, Fiala-Médioni A et al. (1997) Cold seep communities as indicators of fluid expulsion patterns through mud volcanoes seaward of the Barbados accretionary prism. *Deep-Sea Res I* 44(5): 811 - 841.
- Ondréas H, Olu K, Fouquet Y, Charlou JL, Gay A et al. (submitted for publication) Integrated *in situ* study of a giant pockmark on the Gabon margin during the ZAIANGO and BIOZAIRE projects.
- Orcutt B, Boetius A, Lugo SB, MacDonald IR, Samarkin V et al. (2004) Life at the edge of methane ice: microbial cycling of carbon and sulfur in Gulf of Mexico gas hydrates. *Chem Geol* 205: 239-251.
- Orphan VJ, Hinrichs KU, Ussler W, Paull CK (2001) Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate reducing bacteria in anoxic marine sediment. *Appl Env Microbiol* 67: 1922-1934.
- Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF (2001) Methane consuming Archaea revealed by directly-coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* 293: 484-487.
- Overmann J, van Gemerden H (2000) Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 591-599.
- Page H, Fiala-Médioni A, Fisher C, Childress J (1991) Experimental evidence for filter-feeding by the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*. *Deep-sea Res Part I- Oceanographic Research Papers* 38(12): 1455-1461.
- Parker SP (1982) *Synopsis and Classification of Living Organisms*: McGraw-Hill.
- Partensky F, Hess WR, Vaulot D (1999) *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(1): 106-127.
- Paull C, Hecker B, Commeau R, Freemanlynde R, Neumann C et al. (1984) Biological communities at the Florida escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science* 226(4677): 965-967.
- Peek AS, Vrijenhoek RC, Gaut BS (1998) Accelerated evolutionary rate in sulfur oxidizing endosymbiotic Bacteria associated with the mode of symbiont transmission. *Mol Biol Evol* 15(11): 1514-1523.
- Peek AS, Gustafson RG, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1997) Evolutionary relationships of deep-sea hydrothermal vent and cold-water seep clams (*Bivalvia*: *Vesicomidae*): results from the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Mar Biol* 130: 151-161.
- Peek AS, Feldman RA, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1998) Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9962 - 9966.

- Pelmont J (1993) Bactéries et environnement, adaptations physiologiques. Grenoble, France: Presses Universitaires de Grenoble. 894 p.
- Pernthaler A, Amann R (2004) Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl Env Microbiol* 70(9): 5426-5433.
- Pflugfelder B, Fisher CR, Bright M (2005) The color of the trophosome: elemental sulfur distribution in the endosymbionts of *Riftia pachyptila* (Vestimentifera; Siboglinidae). *Mar Biol* 146: 895-901.
- Pile AJ, Young CM (1999) Plankton availability and retention efficiencies of cold-seep symbiotic mussels. *Limnol Oceanogr* 44(7): 1833-1839.
- Pimenov NV, Kalyuzhnaya MG, Khmelenina VN, Mityushina LL, Trotsenko YA (2002) Utilization of methane and carbon dioxide by symbiotrophic bacteria in gills of Mytilidae (*Bathymodiolus*) from the Rainbow and Logatchev hydrothermal fields on the Mid-Atlantic Ridge. *Microbiology* 71(5): 587 - 594.
- Pojeta J (1988) The origin and Paleozoic diversification of solemiid pelecypods. *N M Bur Mines Min Res Mem* 44: 201-222.
- Polz MF, Cavanaugh CM (1995) Unique dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *PNAS* 92: 7232-7236.
- Polz MF, Robinson J, Cavanaugh CM, Van Dover CL (1998) Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnol Oceanogr* 43: 1631-1636.
- Pomerol C, Renard M (1997) *Eléments de géologie*. Paris: Masson. 627 p.
- Pond DW, Dixon DR, Bell MV, Fallick AE, Sargent JR (1997) Occurrence of 16:2(n-4) and 18:2 (n-4) fatty acids in the lipids of the hydrothermal vent shrimps *Rimicaris exoculata* and *Alvinocaris markensis*: nutritional and trophic implications. *Mar Ecol Prog Ser* 156: 167-174.
- Pond DW, Bell MV, Dixon DR, Fallick AE, Segonzac M et al. (1998) Stable-carbon-isotope composition of fatty acids in hydrothermal vent mussels containing methanotrophic and thiotrophic bacterial endosymbionts. *Appl Environ Microbiol* 64(1): 370-375.
- Powell EN, Barber RD, Kennicutt MC, Ford SE (1999) Influence of parasitism in controlling the health, reproduction and PAH body burden of petroleum seep mussels. *Deep-Sea Res* 46: 2053-2078.
- Pradillon F, Shillito B, Young CM, Gaill F (2001) Deep sea ecology - developmental arrest in vent worm embryos. *Nature* 413: 6857.
- Pranal V, Fiala-Medioni A, Guezennec J (1996) Fatty acid characteristics in two symbiotic gastropods from a deep hydrothermal vent of the West Pacific. *Mar Ecol Prog Ser* 142: 175-184.
- Pranal V, Fiala-Médioni A, Guezennec J (1997) Fatty acid characteristics in two symbiont-bearing mussels from deep-sea hydrothermal vents in the south-western Pacific. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 77(2): 473-492.
- Prieur D (1997) Microbiology of deep-sea hydrothermal vents. *Marine Biotechnology* 15: 242-244.
- Pruski AM, Dixon DR (2003) Toxic vents and DNA damage: first evidence from a naturally contaminated deep-sea environment. *Aquatic Toxicology* 64: 1-13.
- Qiu X, Wu L, Huang H, McDonel P, Palumbo AV et al. (2001) Evaluation of PCR-generated chimaeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Env Microbiol* 67(2): 880-887.
- Querellou j, Alain K, Cambon-Bonavita MA (2001) Thermophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Vie Milieu* 51(4): 161-172.
- Rau G, Hedges J (1979) C-13 depletion in a hydrothermal vent mussel - Suggestion of a chemo-synthetic food source. *Science* 203(4381): 648-649.

- Raulfs EC, Macko SA, Van Dover CL (2004) Tissue and symbiont condition of mussels (*Bathymodiolus thermophilus*) exposed to varying levels of hydrothermal activity. *J Mar Biol Ass UK* 84: 229-234.
- Reaney DC (1976) Extrachromosomal elements are possible agents of adaptation and development. *Bacteriol Rev* 40: 552-590.
- Reysenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J (2000) Novel bacterial and Archeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal segment. *Appl Environ Microbiol* 66(9): 3798-3806.
- Rieley G, Van Dover CL, Hedrick DB, Eglinton G (1999) Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance/stable isotope approach. *Mar Biol* 133: 495-499.
- Rio RVM, Lefevre C, Heddi A, Aksoy S (2003) Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: influence of host environment on microbial genome composition. *Appl Environ Microbiol* 69(11): 6825-6832.
- Robinson CA, Bernhard JM, Levin LA, Mendoza GF, Blanks JK (2004) Surficial hydrocarbon seep infauna from the Blake Ridge (Atlantic Ocean, 2150 m) and the Gulf of Mexico (690-2240 m). *Mar Ecol* 25(4): 313-336.
- Robinson JJ, Cavanaugh CM (1995) Expression of form I and form II Rubisco in chemoautotrophic symbioses: Implications for the interpretation of stable carbon isotope values. *Limnol Oceanogr* 40(8): 1496-1502.
- Robinson JJ, Stein JL, Cavanaugh CM (1998) Cloning and sequencing of a form II Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the bacterial symbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *J Bacteriol* 180(6): 1596-1599.
- Robinson JJ, Polz MF, Fiala-Médioni A, Cavanaugh CM (1998) Physiological and immunological evidence for two distinct C1-utilizing pathways in *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae) a dual endosymbiotic mussel from the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol* 132: 625-633.
- Rodriguez-Valera F (2004) Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol Lett* 231(2): 153-158.
- Rosello Mora R, Amann R (2001) The species concept for procaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25: 39-67.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092-1101.
- Rousse N, Boulègue J, Cosson R, Fiala-Médioni A (1998) Bioaccumulation of metal within the hydrothermal mytilidae *Bathymodiolus* sp. from the Mid-Atlantic Ridge. *Oceanologica acta* 21: 597-607.
- Rozan TA, Theberge SM, Luther III GW (2000) Quantifying elemental sulfur (S⁰), bisulfide (HS⁻) and polysulfides (S_x²⁻) using a voltammetric method. *Anal Chim Acta* 415: 175-184.
- Sagan - Margulis L (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14: 225-275.
- Sager WW, MacDonald I, Hou R (2003) Geophysical signatures of mud mounds at hydrocarbon seeps on the Louisiana continental slope, northern Gulf of Mexico. *Mar Geol* 198: 97-132.
- Salas C, Woodside J (2002) *Lucinoma kazani* n. sp. (Mollusca: Bivalvia): evidence of a living benthic community associated with a cold seep in the Eastern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res I* 49: 991-1005.
- Salerno JL, Macko SA, Hallam SJ, Bright M, Won Y et al. (2005) Characterization of symbiont populations in life-history stages of mussels from chemosynthetic environments. *Biol Bull* 208(2): 145-155.
- Sanders N, Childress JJ, McMahon BR (1998) Oxygen transport by the hemocyanin of the protobranch mollusc *Solemya reidi*. *Mar Biol* 131: 293-299.

- Sarradin PM, Caprais JC, Riso R, Kerouel R, Aminot A (1999) Chemical environment of the hydrothermal mussel communities in the Lucky Strike and Menez Gwen vent fields, Mid Atlantic Ridge. *Cah Biol Mar* 40: 93-104.
- Sarradin PM, Caprais JC, Briand P, Gaill F, Shillito B et al. (1998) Chemical and thermal description of the environment of the Genesis hydrothermal vent community (13°N, EPR). *Cah Biol Mar* 39: 159-167.
- Sarrazin J, Robigou V, Juniper SK, Delaney J (1997) Biological and geological dynamics over four years on a high-temperature sulfide structure at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal observatory. *Mar Ecol Prog Ser* 153: 5-24.
- Sassen R, Joye SB, Sweet ST, DeFreitas DA, Milkov AV et al. (1999) Thermogenic gas hydrates and hydrocarbon gases in complex chemosynthetic communities, Gulf of Mexico continental slope. *Org Geochem* 30: 485-497.
- Sassen R, Sweet ST, DeFreitas DA, Milkov AV, Salata GG et al. (1999) Geology and geochemistry of gas hydrates, central Gulf of Mexico continental slope. *Trans Gulf Coast Assoc Geol Soc* 49: 462-468.
- Sassen R, Roberts HH, Carney R, Milkov AV, DeFreitas DA et al. (2004) Free hydrocarbon, gas, gas hydrate, and authigenic minerals in chemosynthetic communities of the northern Gulf of Mexico continental slope: relation to microbial processes. *Chem Geol* 205: 195-217.
- Schmaljohann R, Faber E, Whiticar MJ, Dando PR (1990) Co-existence of methane- and sulphur-based endosymbioses between bacteria and invertebrates at a site in the Skagerrak. *Mar Ecol Prog Ser* 61: 119-124.
- Schrenk MO, Kelley DS, Bolton SA, Baross JA (2004) Low archaeal diversity linked to seafloor geochemical processes at the Lost City hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol*.
- Schwedock J, Hermer TL, Scott KM, Hektor HJ, Seitz AP et al. (2004) Characterization and expression of genes from the RubisCO gene cluster of the chemoautotrophic symbiont of *Solemya velum*: *cbbLSQO*. *Arch Microbiol* 182: 18-29.
- Scott KM, Fisher CR (1995) Physiological ecology of sulfide metabolism in hydrothermal vent and cold seep vesicomyid clams and vestimentiferan tubeworms. *Am Zool* 35: 102-111.
- Scott KM, Schwedock J, Schrag DP, Cavanaugh CM (2004) Influence of form IA RubisCO and environmental dissolved inorganic carbon on the $\delta^{13}C$ of the clam-chemoautotroph symbiosis *Solemya velum*. *Environ Microbiol* 6(12): 1210-1219.
- Segonzac M, Saint Laurent (de) M, Casanova B (1993) L'énigme du comportement trophique des crevettes Alvinocarididae des sites hydrothermaux de la dorsale médio-atlantique. *Cah Biol Mar* 34: 535-571.
- Shock EL (1994) Hydrothermal systems and the emergence of life. *Geotimes* 39(3): 13-14.
- Sibuet M, Olu K (1998) Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep sea cold seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Res II* 45: 517 - 567.
- Sibuet M, Olu-LeRoy K (2002) Cold seep communities on continental margins: structure and quantitative distribution relative to geological and fluid venting patterns. In: Wefer G, Billett D, Hebbeln D, Jorgensen BB, Schlüter M et al., editors. *Ocean margin systems*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 235-251.
- Sibuet M, Juniper SK, Pautot G (1988) Cold-seep benthic communities in the Japan subduction zones: geological control of community development. *Journal of Marine Research* 46: 333-348.
- Sibuet M, Galéron J, Khripounoff A, Menot L, Olu-LeRoy K et al. Deep Sea ecosystems on the equatorial African margin: first results of a pluridisciplinary environmental programme and discovery of chemosynthetic based ecosystems; 2002; Kuala Lumpur.

- Sipe AR, Wilbur AE, Cary SC (2000) Bacterial symbiont transmission in the wood-boring shipworm *Bankia setacea* (Bivalvia: Teredinidae). *Appl Env Microbiol* 66(4): 1685-1691.
- Smith DC, Douglas AE (1987) *The biology of symbiosis*. London: Edward Arnold. 302 p.
- Smith PJ, McVeagh SM, Won Y, Vrijenhoek RC (2004) Genetic heterogeneity among New Zealand species of hydrothermal vent mussels (Mytilidae: *Bathymodiolus*). *Mar Biol* 144(3): 537.
- Southward AJ, Southward EC, Dando PR, Rau GH, Felbeck H et al. (1981) Bacterial symbionts and low $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in tissues of Pogonophora indicate unusual nutrition and metabolism. *Nature* 293: 616.
- Southward E (1986) Gill symbionts in Thyasirids and other bivalve mollusks. *J Mar Biol Assoc UK* 66(4): 889-914.
- Stackenbrandt E, Fredericksen W, Garrity GM, Grimont P, Kampfer P et al. (2002) Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1043-1047.
- Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR (1984) Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science* 224: 409-411.
- Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR, Montgomery L (1988) Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Env Microbiol* 54(5): 1079-1085.
- Stewart FJ, Newton LG, Cavanaugh CM (2005) Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic-anoxic interfaces. *Trends Microbiol* 13(9): 439-448.
- Streams ME, Fisher CR, Fiala-Medioni A (1997) Methanotrophic symbiont location and fate of carbon incorporated from methane in a hydrocarbon seep mussel. *Mar Biol* 129: 465-476.
- Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, Yamamoto S (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(5): 1639-1652.
- Suzuki MT, Preston CM, Beja O, de la Torre JR, Steward GF et al. (2004) Phylogenetic screening of ribosomal RNA gene-containing clones from Bacterial Artificial Chromosome (BAC) libraries from different depths in Monterey Bay. *Micro Ecol In Press*.
- Suzuki Y, Sasaki T, Suzuki M, Nogi Y, Miwa T et al. (2005) Novel chemoautotrophic endosymbiosis between a member of the *Epsilonproteobacteria* and the hydrothermal vent gastropod *Alviniconcha* aff. *hessleri* (Gastropoda: Provannidae) from the Indian Ocean. *Appl Env Microbiol* 71(9): 5440-5450.
- Taiz L, Zieger E (2002) *Plant physiology; associates S*, editor.
- Takai K, Horikoshi K (1999) Genetic diversity of Archaea in deep sea hydrothermal vent environment. *Genetics* 152: 1285 - 1297.
- Takai K, Komatsu T, Inagaki F, Horikoshi K (2001) Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Env Microbiol* Aug.: 3618 - 3629.
- Taylor CD, Wirsen CO (1997) Microbiology and ecology of filamentous sulfur formation. *Science* 277: 1483-1485.
- Teeling H, Meyerdierks A, Bauer M, Amann R, Glockner FO (2004) Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. *Environ Microbiol* 6(9): 938-947.

- Trask JL, Van Dover CL (1999) Site-specific and ontogenetic variations in nutrition of mussels (*Bathymodiolus* sp.) from the Lucky Strike hydrothermal vent field, Mid-Atlantic Ridge. *Limnol Oceanogr* 44(2): 334-343.
- Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K et al. (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* 308(5721): 554-557.
- Tryon MD, Brown KM, Torres ME (2002) Fluid and chemical flux in and out of sediment hosting methane hydrate deposits on Hydrate Ridge, OR, II: Hydrological processes. *Earth Planet Sci Lett* 201: 541-557.
- Tunnicliffe V, Juniper SK, Sibuet M (2003) Reducing environments of the deep-sea floor. In: Tyler PA, editor. *Ecosystems of the world: the deep-sea*: Elsevier Press. pp. 81-110.
- Tunnicliffe V, Embley RW, Holden JF, Butterfield DA, Massoth GJ et al. (1997) Biological colonization of new hydrothermal vents following an eruption on Juan de Fuca Ridge. *Deep-Sea Res* 44: 1627-1644.
- Turnispeed M, Jenkins CD, Van Dover CL (2004) Community structure in Florida Escarpment seep and Snake Pit (Mid-Atlantic Ridge) vent mussel beds. *Mar Biol*(121-132).
- Urakawa H, Dubilier N, Fujiwara Y, Cunningham DE, Kojima S et al. (2005) Hydrothermal vent gastropods from the same family (Provannidae) harbour e- and g-proteobacterial endosymbionts. *Environ Microbiol* 7(5): 750-754.
- Vacelet J, Boury-Esnault N, Fiala-Médioni A, Fisher CR (1995) A methanotrophic carnivorous sponge. *Nature* 377: 296.
- Van Dover CL (2000) *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 424 p.
- Van Dover CL, Fry B (1989) Stable isotopic compositions of hydrothermal vent organisms. *Mar Biol* 98: 209-216.
- Van Dover CL, Szuts EZ, Chamberlain SC, Cann JR (1989) A novel eye in "eyeless" shrimp from hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Nature* 337: 458-460.
- Van Dover CL, Fry B, Grassle JF, Humphris S, Rona PA (1988) Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol* 98: 209-216.
- Vetter RD (1985) Elemental sulfur in the gills of three species of clams containing chemoautotrophic symbiotic bacteria: a possible inorganic energy storage compound. *Mar Biol* 88: 33-42.
- Vetter RD, Fry B (1998) Sulfur contents and sulfur-isotope compositions of thiotrophic symbioses in bivalve molluscs and vestimentiferan worms. *Mar Biol* 132(3): 453-460.
- Von Cosel R (2002) A new species of bathymodioline mussel (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) from Mauritania (West Africa), with comments on the genus *Bathymodiolus* Kenl & Wilson, 1985. *Zoosystema* 24(2): 259 - 271.
- Von Cosel R, Olu K (1998) Gigantism in Mytilidae. A new *Bathymodiolus* from cold seep areas on the Barbados accretionary Prism. *C R Acad Sci III-Vie* 321: 655-663.
- Von Cosel R, Marshall BA (2003) Two new species of large mussels (Bivalvia: Mytilidae) from active submarine volcanoes and a cold seep off the eastern North Island of New Zealand, with description of a new genus. *The Nautilus* 117(2): 31-46.
- Von Cosel R, Métivier C, 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(4): 374-392.
- 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(3): 218-248.

- Von Damm KL (1995) Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal vents. In: Humphris S, Zierenberg RA, Mullineaux LS, Thomson RE, editors. Seafloor hydrothermal systems: physical, chemical, biological and geological interactions Geophys Monogr Am Geophys Union. pp. 222-247.
- Vrijenhoek RC, Schutz SJ, Gustafson RG, Lutz RA (1994) Cryptic species of deep-sea clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomidae) from hydrothermal vent and cold water seep environments. *Deep-Sea Res* 41: 1171-1189.
- Ward DM (1998) A natural species concept for prokaryotes. *Curr Op in Microb* 1: 271 - 277.
- Ward ME, Shields JD, Van Dover CL (2004) Parasitism in species of *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) mussels from deep-sea seep and hydrothermal vents. *Dis Aquat Org* 62(1-2): 1-16.
- Wàren A, Bouchet P (2001) Gastropoda and monoplacophora from hydrothermal vents and seeps: new taxa and records. *The Veliger* 44(2): 116 - 231.
- Wàren A, Bengston S, Goffredi SK, Van Dover CL (2003) A hydrothermal-vent gastropod with iron sulfide biomineralized dermal sclerites. *Science* 302: 1007.
- Wernegreen JJ, Degnan PH, Lazarus AB, Palacios C, Bordenstein SR (2003) Genome evolution in insect cells: distinct features of an ant-bacterial relationship. *Biol Bull* 204: 221-231.
- Windoffer R, Giere O (1997) Symbiosis of the hydrothermal vent gastropod *Ifremeria nautilei* (Provannidae) with endobacteria - Structural analyses and ecological considerations. *Biol Bull* 193: 381-392.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* June: 221 - 271.
- Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(11): 5088-5090.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Toward a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4576 - 4579.
- Won Y, Maas PAY, Van Dover CL, Vrijenhoek RC (2002) Habitat reversal in vent and seep mussels: seep species, *Bathymodiolus heckerae*, derived from vent ancestors. *Cah Biol Mar* 34: 387-390.
- Won Y, Young CR, Lutz RA, Vrijenhoek RC (2003) Dispersal barriers and isolation among deep-sea mussel populations (Mytilidae: *Bathymodiolus*) from Eastern Pacific hydrothermal vents. *Mar Ecol* 12: 169-184.
- Won YJ, Hallam SJ, O'Mullan D, Vrijenhoek RC (2003) Cytonuclear disequilibrium in a hybrid zone involving deep-sea hydrothermal vent mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Mol Ecol* 12: 3185-3190.
- Won YJ, Hallam SJ, O'Mullan D, Pan IL, Buck KR et al. (2003) Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Appl Env Microbiol* 69(11): 6785-6792.
- Woolfit M, Bromham L (2003) Increased rates of sequence evolution in endosymbiotic bacteria and fungi with small effective population sizes. *Mol Biol Evol* 20(9): 1545-1555.
- Yamaguchi T, Newman WA, Hashimoto J (2004) A cold seep barnacle (Cirripedia: Neolepadinae) from Japan and the age of the vent/seep fauna. *J Mar Biol Ass UK* 84(1): 111-120.
- Yamamoto H, Fujikura K, Hiraishi A, Kato K, Maki Y (2002) Phylogenetic characterization and biomass estimation of bacterial endosymbionts associated with invertebrates dwelling in chemosynthetic communities of hydrothermal vents and cold seeps. *Mar Ecol Prog Ser* 245: 61-67.

- Zal F, Leize E, Oros DR, Hourdez S, Van Dorsselaer A et al. (2000) Haemoglobin structure and biochemical characteristics of the sulphide-binding component from the deep sea clam *Calymene magnifica*. *Cah Biol Mar* 41(4): 413-423.
- Zbinden M, Cambon-Bonavita MA (2003) Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiology ecology* 1550: 1-8.
- Zbinden M, Le Bris N, Gaill F, Compère P (2005) Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata*, and related biogeochemical processes. *Mar Ecol Prog Ser*.

Symbioses bactériennes de bivalves mytilidés associés aux sources de fluides en domaine océanique profond : diversité, rôle nutritionnel et influence de l'environnement

Les associations symbiotiques entre invertébrés et bactéries chimiosynthétiques comptent parmi les principales sources de production primaire dans les écosystèmes associés aux sources de fluides en domaine océanique profond. Les moules du genre *Bathymodiolus* (Bivalvia : Mytilidae) dominent de nombreux sites de fluides froids, riches en méthane, sur les marges continentales et de nombreux sites hydrothermaux, riches en sulfures, au niveau des dorsales océaniques. Certaines espèces sont associées à deux types distincts de bactéries : des méthanotrophes et des sulfoxydantes. Ces mytilidés constituent donc un bon modèle pour l'étude de la diversité, du rôle et de l'écologie des associations symbiotiques multiples. Pour cette étude, plusieurs espèces de mytilidés ont été collectées, à l'aide de submersibles, sur différents sites de fluides situés à des profondeurs allant de 850 à 3300 mètres. Les bactéries associées à ces mytilidés ont été caractérisées par l'analyse comparative des séquences de leur ARNr 16S ainsi que de gènes fonctionnels. Une diversité bactérienne bien plus élevée que ce qui était attendu a été mise en évidence chez deux espèces : quatre phylotypes bactériens ont ainsi été identifiés chez *B. heckerae* (Golfe du Mexique), et six chez *Idas* sp., un mytilidé de petite taille (Méditerranée orientale). Les méthodes d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes spécifiques (FISH) et d'hybridation quantitative d'ARN sur membrane (slot blot) ont été employées pour étudier l'influence de l'environnement sur les symbioses. Aucune variation d'abondance des deux phylotypes bactériens associés à *Bathymodiolus* sp. (Golfe de Guinée) n'a été constatée, en dépit des concentrations de méthane très différentes relevées au niveau des trois agrégats de mytilidés échantillonnés. Les abondances relatives des différents phylotypes, ainsi que l'abondance bactérienne totale, varient en revanche entre espèces et entre sites chez *B. brooksii* (Golfe du Mexique), *B. azoricus* et *B. puteoserpentis* (ride Médio-Atlantique). Pour ces deux derniers, la variation d'abondance des bactéries méthanotrophes par rapport aux sulfoxydantes a pu être reliée aux caractéristiques des fluides hydrothermaux, notamment à leur concentration en méthane. Le rôle nutritionnel des bactéries a été étudié par l'analyse isotopique de tissus et de biomarqueurs (lipides et ARNr 16S). La prédominance de la méthanotrophie dans la nutrition de *B. brooksii*, *B. heckerae* et *B. childressii* (Golfe du Mexique), chez lesquelles les bactéries symbiotiques méthanotrophes sont majoritaires, a ainsi été confirmée. Le travail présenté ici montre l'intérêt de combiner les approches moléculaires et isotopiques avec l'étude écologique et physico-chimique de l'environnement pour mieux comprendre les symbioses qui sont à la base du développement des communautés animales caractéristiques des écosystèmes associés aux fluides froids et aux sources hydrothermales.

Mots clés : symbiose, *Bathymodiolus*, *Idas*, bactéries sulfoxydantes, bactéries méthanotrophes, bactéries méthylophiles, CFB, ARNr 16S, APS, RubisCO, pmoA, isotopes stables, analyse lipidique, sources de fluides froids, sources hydrothermales, chimiosynthèse, Golfe du Mexique, Golfe de Guinée, Méditerranée orientale, ride Médio-Atlantique

Bacterial symbioses in mytilid bivalves associated with cold seeps and hydrothermal vents : diversity, nutritional role and influence of the environment

Symbiotic associations between chemosynthetic bacteria and invertebrates are one of the major sources of primary production in deep-sea chemosynthesis-based ecosystems. Mussels of the genus *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) occur worldwide and can dominate the animal community at methane-rich cold seeps and sulfide-rich hydrothermal vents. Some species are associated with both sulfide-oxidizing and methanotrophic bacteria. These mussels are thus a good model for studying the diversity, role and ecology of multiple symbiotic associations, which are still poorly understood. For the present study, several species of mytilids were collected from seep and vent sites situated at depths from 850 to 3300 meters using submersibles. Symbiotic bacteria associated with these mytilids were characterized using comparative 16S rRNA and functional gene sequence analysis. In two species, the diversity of symbionts was much greater than expected, with four bacterial phylotypes in *B. heckerae* from the Gulf of Mexico and six phylotypes in *Idas* sp., a small mytilid from the eastern Mediterranean. The existence of an environmental influence on the abundance of the different bacterial phylotypes was assessed using fluorescence *in situ* hybridization and quantitative RNA hybridization. For *Bathymodiolus* sp. from the Gulf of Guinea, results were compared to environmental data, and no variation was seen between specimens collected on mussel beds with different methane concentrations. Relative and overall abundances of bacteria varied between species and sites in *B. brooksii* (Gulf of Mexico), *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* (Mid-Atlantic Ridge). For the latter two species, the variation could be linked to characteristics of hydrothermal fluids, in particular to methane concentrations. The nutritional role of the symbiotic bacteria was investigated using stable isotope analyses, performed on whole tissues and specific biomarkers such as lipids and RNA. In *B. heckerae*, *B. brooksii* and *B. childressii* from the Gulf of Mexico, in which methanotrophs are the most abundant symbionts, methanotrophy was confirmed as the main source of carbon nutrition. This study emphasizes the relevance of combining molecular and stable isotope approaches with deep-sea environment investigations to understand the symbioses that fuel the metazoan communities occurring in cold seep and hydrothermal ecosystems.

Keywords: symbiosis, *Bathymodiolus*, *Idas*, sulfide-oxidizing bacteria, methanotrophic bacteria, methylotrophic bacteria, CFB, 16S rRNA, APS, RubisCO, pmoA, stable isotopes, lipid analysis, cold seeps, hydrothermal vents, chemosynthesis, Gulf of Mexico, Gulf of Guinea, eastern Mediterranean, Mid-Atlantic Ridge