



Mode de reconnaissance hôte symbionte en milieux extrêmes : cas du modèle symbiotique *Rimicaris exoculata*

Simon Le Bloa

► To cite this version:

Simon Le Bloa. Mode de reconnaissance hôte symbionte en milieux extrêmes : cas du modèle symbiotique *Rimicaris exoculata*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT : 2016BRES0119 . tel-02003354

HAL Id: tel-02003354

<https://theses.hal.science/tel-02003354>

Submitted on 1 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



université de bretagne
occidentale

UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Ecologie Microbienne

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Simon Le Bloa

Préparée à l'UMR 6197, Ifremer-CNRS-UBO

Etablissement de rattachement : Ifremer, Centre de Brest

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

Mode de reconnaissance
hôte-symbionte en milieux
extrêmes: cas du modèle
symbiotique, la crevette
Rimicaris exoculata

Thèse soutenue le 15 décembre 2016

devant le jury composé de :

Sébastien Duperron (Rapporteur)

Maître de Conférences, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

Abdelazis Heddi (Rapporteur)

Professeur, Directeur du Laboratoire Biologie Fonctionnelle
Insectes et Interactions - INSA Lyon

Christine Paillard (Examinatrice)

Directeur de Recherche, Laboratoire des Sciences de
l'Environnement Marin

Mohamed Jebbar (Examineur)

Directeur du Laboratoire de Microbiologie des Environnements
Extrêmes, Professeur Université de Bretagne Occidentale

Aurélié Tasiemski (Examinatrice)

Maître de Conférences, Université de Lille I

Alexis Bazire (Co-Directeur de thèse)

Maître de Conférences, Université de Bretagne Sud

Marie-Anne Cambon-Bonavita (Directrice de thèse)

Chercheur, Laboratoire de Microbiologie des Environnements
Extrêmes

Remerciements

Après 3 ans à voguer sur les flots de la thèse, parfois mouvementés, parfois placides, me voilà arrivé à bon port. Je n'ai vraiment pas vu le temps passer. Ma première navigation dans la recherche ne s'est évidemment pas faite toute seule. Il est temps de remercier les membres d'équipages, les personnes et les organismes qui ont contribué à mener à bien ce projet.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), UMR6197 (Ifremer/UBO/CNRS), à l'Ifremer de Brest ; au Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine (LBCM), EA3884 (UBS) à Lorient et au Laboratoire de Génétique et Evolution des Végétaux (GEPV), UMR 8198, (CNRS/Université de Lille1). Je remercie l'Ifremer, le LabexMer, l'ANR Carnot EDROME, le projet MIDAS qui ont apporté leur soutien financier pour la réalisation de ce projet de thèse.

Je souhaite dans un premier temps exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à ma directrice de thèse, Marie-Anne Cambon-Bonavita, chercheur responsable de l'équipe « Interactions et Symbioses » au LM2E. Un grand merci pour ta présence, tes conseils, ton encadrement en général qui m'a permis d'évoluer professionnellement dans de bonnes conditions au cours de ces années. Enfin un grand merci pour m'avoir donné l'opportunité de participer à la campagne océanographique BICOSE, qui restera pour moi un de mes plus beaux moments de ma vie professionnelle et personnelle.

Je souhaite ensuite remercier Alexis Bazire pour son encadrement et pour tous ses conseils sur la communication bactérienne. Je remercie par la même occasion Alain Dufour directeur du laboratoire pour nos échanges lors de mes passages à Lorient.

Je tiens à remercier M. Abdelaziz Heddi, professeur à l'INSA de Lyon et M. Sébastien Duperron, maître de conférences à l'Université Pierre et Marie Curie pour avoir jugé ce travail en tant que rapporteurs, ainsi que les autres membres du jury que sont Christine Paillard, Mohamed Jebbar et Aurélie Tasiemski.

Merci aux membres de mon comité de thèse : Florence Pradillon, Gwenaëlle Le Blay et Yannick Fleury pour leurs avis et recommandations.

Un grand merci à toute l'équipe du LM2E, qui durant ces trois années a été dirigée par Mohamed Jebbar et Anne Godfroy qui a ensuite laissé place à Didier Flament. Je les remercie vivement pour leurs gestions et leurs avis scientifiques. Merci aussi à tous ceux qui m'ont apporté une aide technique et scientifique durant ces trois ans. Je remercie le chef de mission et les chefs de projets de la campagne océanographique BICOSE 2014, le capitaine du navire, les membres d'équipages et les membres de l'équipe chargé du ROV Victor 6000 pour leur efficacité.

Je voudrais remercier Aurélie Tasiemski, maître de conférences à l'Université de Lille¹ et responsable de l'équipe Immunologie au sein du GEPV. Merci pour tous tes conseils, nos discussions sur l'immunité de cette chère *Rimicaris* et pour m'avoir fait ouvrir la porte du monde formidable de l'immunité.

Un grand merci à Valérie, ingénieur au LM2E, et merci Céline, ingénieur au GEPV, pour toute l'aide que vous m'avez fourni durant ces travaux de thèse, pour vos conseils et nos échanges techniques et pour avoir pris le temps de m'expliquer et montré les différentes procédures expérimentales de cette thèse. Mais je tiens surtout à vous remercier pour votre patience à mes questions, parfois redondantes, sur toutes ces expérimentations. Un grand merci à François qui m'a bien aidé durant son stage d'IUT. Cela a été un grand plaisir de t'encadrer durant ton stage. Je te souhaite bon vent pour la suite !

Merci à Frédérique Duthoit pour m'avoir donné l'opportunité de donner quelques TP à l'IUT dans des conditions optimales. Cela a été vraiment une super expérience et très enrichissant d'un point de vue pédagogique.

Je voudrais te remercier Lucile, pour m'avoir mis le pied à l'étrier sur ce formidable modèle biologique, pour m'avoir fait part de ton expérience et de ton savoir-faire. Il n'y a pas de grand projet sans de bonnes bases.

Je voudrais remercier les doctorants en commençant par les anciens du LM2E, les vétérans, à commencer par mes « maîtres viroboy », Joonas et Julien, ainsi que Grégoire « chimichanga », et Fred. Merci pour ces soirées à refaire le monde de la science et surtout à chanter du Pierre Bachelet en franglais (je pense qu'un marché s'offre à nous). « The north it was the coron... ». Je tiens à remercier ensuite le jukebox ambulant, la radio du LM2E, j'ai nommé... Matthieu. Que de chemin parcouru depuis nos stages. Merci pour tes nombreuses blagues et jeux de mots et pour nos délires qui m'ont souvent remonté le moral. Merci également à mes deux partenaires de danse. Merci à toi Gaëlle pour la danse celtique qui a consisté à trotter durant chaque farandole et autre quartet en essayant de ne pas me mélanger les bras. Merci à toi Sandrine pour tous nos cours et soirée salsa où j'ai dû parfois improviser quelques enchainements. Merci à vous trois ainsi qu'Aline et Guillaume pour nos folles soirées jeux de sociétés et autres.

Merci aussi à toi Morgane pour tous tes bons plans festifs qui m'ont permis de découvrir la vie culturelle de Brest.

Je tiens à remercier l'équipe actuelle des doctorants. Merci Sébastien pour tes remarques qui ont fait souvent mouche. Merci à mon quatuor féminin de choc, mes drôles de dames, Caroline, Yang, Charlène et Mélanie (ma chère « supplémente ») pour nos discussions scientifiques, administratives, et pour toutes nos soirées brestoises épiques ! Une spéciale dédicace à l'équipe

de rédaction de la news letter du LM2E : Vincent, Charlène, Tiphaine, Florian, Clarisse et bien sûr Etienne, qui ont toujours eu de bonnes idées pour enrichir l'actu du labo, imaginer de nouveaux concepts et formats de présentations. Cela a été un vrai plaisir d'être votre rédac chef. Continuez à vous faire plaisir et faites nous rêver ! Enfin je terminerais par mon cher voisin de bureau, mon collègue de la « team » crevette (j'attends toujours le logo d'ailleurs). Merci pour tous tes coups de main en bio-informatique et surtout de ta patience pour m'expliquer comment apprivoiser certains logiciels récalcitrants. Merci pour toutes nos discussions sur nos modèles respectifs, sur nos projet d'amélioration de la news letter (j'ai pu voir la version numérique avant de partir !), et surtout pour ton imagination débordante qui nous a amené à des concepts parfois étonnants (la cuisine d'une crevette en deux secondes, les 6 manières éthiques d'exploiter son stagiaire...).

Merci à toute l'équipe de volley qui m'a permis de bien me défouler et surtout de bien rigoler durant cette thèse. Rappelle des principes de bases « quand on défend, on attaque » et surtout « autant sur le plan tacheutique, que techeunique » il ne faut pas hésiter à « lâcher les poneys ! ». Merci coach pour tous tes conseils notamment sur le comment du pourquoi du mouvement du smatch. Bon, il faudra peut-être repenser notre cri de guerre. « Houba, houba... Hop ! ».

Manue, Cricri, un grand merci pour tous ces fous rire, cette bonne humeur, nos soirées endiablées sur le dance floor et nos opérations « ponton ». Sans vous, cette année aurait manqué de piments. Et merci Christine pour avoir toujours répondu présente pour les commandes, ordre de missions et autres questions administratives.

Je voudrais remercier Cécile et Coraline, mes compagnes de route, mes amies, qui ont elles aussi débuté cette incroyable aventure dans la recherche. Je vous remercie pour toutes nos discussions, nos échanges sur nos déboires de manips, mais aussi nos réussites. Bon courage pour la soutenance !

Je voudrais remercier mes amis de toujours, ma « dream team » de Normandie, les « coucou c'est nous ». Merci les amis pour toutes nos méga fêtes et nos escapades dans le sud de la France durant les vacances. Vous m'avez apporté une formidable bulle d'oxygène durant ces 3 ans.

Je voudrais enfin remercier toute ma famille, qui s'est toujours montré intéressée à la vie d'un chercheur en herbe. Je les remercie de leur sollicitude concernant mes « crevettes à grosse tête ». Papa, maman, Pierre et Marie je tiens à vous dire un grand merci pour m'avoir toujours soutenu, souvent conseillé, et sans qui je n'aurais pas pu accomplir ce formidable challenge. Du fond du cœur merci.

J'aimerais dédier cette thèse pour finir à mon grand-père, qui a parcouru l'ensemble des mers du globe, et pour qui la mer était une seconde maison. Beaj vat !

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	2
Chapitre 1 : Introduction	5
I. La symbiose dans le monde vivant	6
1. Mode de transmission des symbiontes microbiens	8
1.1 Transmission verticale	10
1.2 Transmission horizontale	12
2. Les moyens de reconnaissances et d'attachements hôte – symbiontes microbiens ..	14
2.1. Acquisition héréditaire	15
2.2 Acquisition environnementale	16
II. Régulations des populations symbiotiques	17
1. Communiquer pour mieux s'installer	19
1.1 Le Quorum Sensing chez les bactéries à Gram négatif	20
1.2 Le Quorum Sensing chez les bactéries à Gram positif	21
1.3 La communication inter espèce : l'auto-inducteur de type 2 (AI-2)	21
1.4 La communication hôte-symbionte	22
1.4.1 Réponse de l'hôte aux auto-inducteurs du QS	22
1.4.2 Communication de l'hôte aux bactéries	23
2. Acquisition ou Infection ?	24
2.1 Le symbionte face à l'hôte	24
2.2 L'hôte face au symbionte	26
2.3 L'immunité chez les insectes	27
2.3.1 Anatomie de l'immunité des insectes	27
2.3.2 La signalisation immunitaire	29
2.4 L'immunité chez les crustacés	31
2.4.1 Les peptides antimicrobiens : structures et modes d'actions	31
2.4.3 Rôle des peptides antimicrobiens chez la crevette	38
III. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds	40
1. Qu'est-ce qu'un écosystème hydrothermale océanique profond ?	41
1.1. Localisation des gisements hydrothermaux profonds	41
1.2. Naissance des édifices hydrothermaux profonds	42
1.3. Les sites hydrothermaux de l'Atlantique	45
2. Les microorganismes des sources hydrothermales océaniques	51
2.1. Les métabolismes bactériens en présence dans ces écosystèmes	52
2.2. Les types d'habitats microbiens et les microorganismes associés	53

2.3. Les microorganismes chimiosynthétiques : des partenaires idéals	55
3. Les associations symbiotiques dans les écosystèmes hydrothermaux	56
3.1 Le vestimenfère <i>Riftia pachyptila</i>	56
3.2 La moule <i>Bathymodiolus azoricus</i>	58
3.3 Le ver annélide <i>Alvinella pompejana</i>	60
IV. Notre modèle d'étude : la crevette <i>Rimicaris exoculata</i>	61
1. Biologie et cycle de vie de la crevette <i>R. exoculata</i>	62
2. La symbiose du tractus digestif	69
3. La symbiose du céphalothorax	73
3.1 Une communauté complexe et organisée	73
3.2 Rôle trophique	76
3.3 Une communauté aux fonctions diverses	77
3.4. Une installation ordonnée	79
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	83
I.Campagne Océanographique	84
1. Echantillonnage	84
2. Expériences sous pression	86
II. Extraction et dosage des homosérines lactones (AHL)	89
1. Extraction	89
2. Détection par spectrométrie de masse LC-MS-MS.....	90
III. Approche génétique.....	91
1. Extraction du matériel génétique.....	91
2. Amplification des gènes ciblés	92
3. Clonage, séquençage et analyse des séquences	94
4. RT-PCR quantitative relative	95
IV. Analyse protéique de la Re-crustine.....	96
1. Extraction et dosage des protéines	96
2. Western blot	96
V. Observation par hybridation fluorescente in situ (FISH)	98
Chapitre 3 : Mise en évidence de gènes lux du Quorum Sensing et de leur expression chez la communauté épibiontique de la crevette <i>Rimicaris exoculata</i>. Utilisation possible comme marqueurs de biogéographie.	101
1. Introduction de l'étude	102
2. Méthode expérimentale utilisée.....	103

3. Article : Mise en évidence de gènes <i>lux</i> du Quorum Sensing et de leur expression chez la communauté épibiontique de la crevette <i>Rimicaris exoculata</i> . Utilisation possible comme marqueurs de biogéographie.....	104
4. Principaux résultats de l'étude	156

Chapitre 4 : Identification de la Re-crustine, peptide antimicrobien impliqué dans l'ectosymbiose de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*...... 159

1. Introduction de l'étude	160
2. Méthode expérimentale utilisée	161
3. Article : Identification de la Re-crustine, peptide antimicrobien impliqué dans l'ectosymbiose de la crevette hydrothermale <i>Rimicaris exoculata</i>	161
4. Principaux résultats de l'étude	195

Chapitre 5 : Synthèse de l'étude..... 197

I. Synthèse de l'étude	198
1. La communication hôte-symbiote	198
2. L'immunité chez la crevette <i>Rimicaris exoculata</i>	201
II. Discussion et perspectives sur notre modèle d'étude	203
1. <i>Rimicaris exoculata</i> et ses symbiotes : une possible communication interrègne	203
2. Des etosymbiotes sous contrôle	206
III. Conclusion.....	209

Annexes..... 211

Annexe 1: Mise en place d'une étude d'éco-toxicologie pour la faune hydrothermale océanique profonde et ses symbiotes grâce au modèle <i>Rimicaris exoculata</i>	213
1. Introduction de l'étude	214
2. Méthode expérimentale	215
3. Article :Mise en place d'une étude d'éco-toxicologie pour la faune hydrothermale océanique profonde et ses symbiotes grâce au modèle <i>Rimicaris exoculata</i>	215
4. Principaux résultats de l'étude	225

Annexe 2 : Etude en cours : Etude de la diversité symbiotique chez la crevette mâle hydrothermale <i>Rimicaris exoculata</i>	227
1. Introduction de l'étude	228
2. Méthode expérimentale	228
3. Etude en cours : étude de la diversité symbiotique chez la crevette hydrothermale mâle <i>Rimicaris exoculata</i>	229

Bibliographie..... 241

LEXIQUE

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AHL : acyl-homosérines lactones

ALFs : facteurs anti-lipopolysaccharides

BET : bromure d'éthyldium, intercalant des bases de l'ADN.

BLAST: '*Basic Local Alignment Search Tool*'

CBB : (Cycle de) Calvin-Benson-Bassham

DO : Densité Optique.

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

LB : Lame branchiostège ou branchiostégite

LC-MS-MS : Liquid chromatography–mass spectrometry (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse)

MAR : Ride Médio-Atlantique.

PAM : peptides antimicrobiens

pb : paires de bases, unité de longueur de l'ADN.

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne).

Q-PCR : Quantitative real time polymerase chain reaction (PCR quantitative)

QS : Quorum Sensing

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR (transcription inverse suivi d'une PCR)

Sc: Scaphognathite

TAG: Trans Atlantic Geotraverse

TD : tube digestif

Tm : température de fusion.

UV : Longueurs d'ondes appartenant au domaine des ultra-violets.

WAP : motif "whey acidic protein" ou domaine protéique acide des crustines

ECL : enhanced chemiluminescence

LISTE DES TABLEAUX et FIGURES

TABLEAUX

1- Type d'interactions entre individus au sein d'un écosystème.	p.7
2- Classification des peptides antimicrobiens (PAM) chez les crustacés selon leur composition en acides aminés et leur structure.	p. 34
3- Propriétés antimicrobienne des facteurs antimicrobiens chez la crevette.	p.40
4- Concentrations de certains minéraux et gaz mesurées dans les fluides hydrothermaux purs des sites de la MAR Rainbow, Logatchev, Ashadze, TAG et Snake Pit.	p.51
5- Exemples des principaux métabolismes bactériens connus dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques.	p.53
6- Caractéristiques de diverses symbioses impliquant des bactéries chimiotrophes.	p.55
7- Gradient d'élution	p.90
8- Amorces PCR utilisées dans cette étude	p.92
9- Amorces RT-PCR quantitative utilisées dans cette étude	p.96
10- Distribution des banques de clones du gène ARNr 16S chez les crevettes mâles <i>R. exoculata</i> situés à proximité (agrégats) ou en périphérie (nasse) des cheminées hydrothermales actives du site TAG.	p.229

FIGURES

Figure 1 : Les différents modes de transmission des symbiontes microbiens	p.9
Figure 2 : Exemples de cycles de vie simplifiés d'hôtes possédant des symbiontes transmis verticalement	p.11
Figure 3 : Exemples de cycles de vie simplifiés d'hôtes possédant des symbiontes transmis horizontalement	p.13
Figure 4 : Cycle de vie d'un biofilm chez <i>Bacillus subtilis</i>	p.18
Figure 5 : Les différents systèmes de Quorum Sensing	p.20
Figure 6 : Schéma représentant le fonctionnement d'un système de sécrétion de type III (T3SS)	p.25
Figure 7 : Anatomie du système immunitaire des insectes	p.28
Figure 8 : Schéma simplifié illustrant les principaux acteurs des voies Toll, Imd et Jak/Stat, en utilisant les moustiques comme exemple	p.29
Figure 9 : Mécanismes clés de la rupture de la membrane cytoplasmique bactérienne par un peptide antimicrobien (PAM)	p.32
Figure 10 : Peptides antimicrobiens à domaine multiple chez les crustacés	p.38
Figure 11 : Répartition des facteurs antimicrobiens chez la crevette	p.40
Figure 12 : Carte mondiale des systèmes hydrothermaux recensés	p.42

Figure 13 :	Représentation schématique du fonctionnement d'une source hydrothermale profonde	p.43
Figure 14 :	Fumeurs noirs du site Logatchev (MAR)	p.44
Figure 15 :	Fumeurs blancs d'une zone volcanique	p.44
Figure 16 :	Carte des principaux sites hydrothermaux recensés sur la MAR	p.46
Figure 17 :	Carte bathymétrique du site Rainbow sur la MAR	p.47
Figure 18 :	Photos prises sur le site hydrothermal Rainbow	p.47
Figure 19 :	Carte bathymétrique de la campagne SERPENTINE (2007) sur la MAR	p.48
Figure 20 :	Photographies prise sur le site Logatchev lors de la campagne SERPENTINE	p.48
Figure 21 :	Photographies prises sur le site Ashadze lors de la campagne SERPENTINE	p.49
Figure 22 :	Photographies prises sur le site hydrothermal TAG (Campagne BICOSE 2014)	p.50
Figure 23 :	Photographies prises sur le site hydrothermal Snake Pit (Campagne BICOSE 2014)	p.51
Figure 24 :	Différentes options métaboliques pour l'obtention d'énergie	p.52
Figure 25 :	Représentation des différents types de métabolismes bactériens associés à l'hydrothermalisme	p.54
Figure 26 :	Le vestimentifères <i>Riftia pachyptila</i>	p.58
Figure 27 :	<i>Bathymodiolus azoricus</i> sur le site hydrothermal Lucky Strike sur la MAR	p.58
Figure 28 :	Section transversale de filaments branchiaux de <i>Bathymodiolus azoricus</i> en FISH	p.60
Figure 29 :	<i>Alvinella pompejana</i> .	p.61
Figure 30 :	Agrégats de <i>Rimicaris exoculata</i> sur le site TAG (Campagne BICOSE, 2014)	p.62
Figure 31 :	Représentation schématique d'une cheminée hydrothermale colonisée par <i>R. exoculata</i>	p.62
Figure 32 :	<i>Rimicaris exoculata</i>	p.63
Figure 33 :	Morphologie de la symbiose de la cavité céphalothoracique de <i>Rimicaris exoculata</i> .	p.64
Figure 34 :	Schéma montrant les mouvements d'eau permettant l'oxygénation des branchies chez <i>R. exoculata</i>	p.64
Figure 35 :	Œufs et larve venant d'éclore de <i>R. exoculata</i>	p.65
Figure 36 :	Images de microscopie électronique de larve de zoé I de <i>Rimicaris exoculata</i>	p.66
Figure 37 :	Juvéniles de <i>R. exoculata</i> et <i>R. exoculata</i> adulte	p.67
Figure 38 :	Schéma du cycle de mue de <i>Rimicaris exoculata</i> montrant une vue interne des branchiostégites (Br) à différentes phases du cycle	p.68

Figure 39 :	Représentation schématique des trois portions du tube digestif de <i>R. exoculata</i>	p.69
Figure 40 :	Images de microscopie électronique de la paroi du tube digestif de <i>R. exoculata</i>	p.70
Figure 41 :	Observation d'épibiontes du tube digestif d'un spécimen de <i>R. exoculata</i> de Rainbow ayant subi un jeûne long	p.71
Figure 42 :	Arbres phylogénétiques des séquences d'ARNr 16S des épibiontes <i>Epsilon</i> - et <i>Gammaprotéobactériens</i> de <i>R. exoculata</i> , basés sur la méthode du Maximum Likelihood	p.74
Figure 43 :	<i>Rimicaris exoculata</i> . Images prises en microscopie photonique et MEB	p.75
Figure 44 :	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH) sur des soies bactériophores de scaphognathite de <i>Rimicaris exoculata</i>	p.75
Figure 45 :	Vue schématique de <i>R. exoculata</i> (a) et de sa cavité céphalothoracique en coupe transversale (b) montrant les taux d'incorporation du ¹⁴ C dans les organes internes de la crevette	p.76
Figure 46 :	Fonctionnement hypothétique de la communauté symbiotique du céphalothorax et des interactions hôtes-symbiontes	p.79
Figure 47 :	Mise en place de la communauté symbiotique du céphalothorax de <i>R. exoculata</i> au cours d'un cycle de mue	p.80
Figure 48 :	Prélèvement des crevettes <i>Rimicaris exoculata</i> sur les cheminées hydrothermales avec l'aspirateur à faune et la Periscopette®.	p.85
Figure 49 :	Photos en (a) du navire océanographique <i>Pourquoi pas ?</i> , en (b) du submersible non habité <i>Victor 6000</i> et en (c) du submersible habité <i>Nautilie</i>	p.85
Figure 50 :	Photographie de <i>Rimicaris exoculata</i> en phase post –ecdysiale (après la mue) (A) et pré-ecdysiale (avant la mue) (B)	p.86
Figure 51 :	Outils pour le prélèvement et d'expérimentation <i>in vivo</i> des animaux marins profonds.	p.87
Figure 52 :	Expérimentation de compétition des symbiontes de <i>R. exoculata</i> en aquarium pressurisée BALIST (Campagne BioBaz 2013 et BICOSE 2014)	p.88
Figure 53 :	Western blot, transfert sur membrane	p.97
Figure 54 :	Western blot couplé avec ECL	p.98
Figure 55 :	Proposition d'un modèle de communication globale de la communauté symbiotique du céphalothorax chez <i>Rimicaris exoculata</i>	p.205
Figure 56 :	Production de l'alvinallacine dans les tissus en contact avec les symbiotes	p.207
Figure 57 :	Histogramme représentant la diversité symbiotique chez le mâle <i>Rimicaris exoculata</i> (résultats préliminaires).	p.231
Figure 58 :	Observation en microscopie FISH d'ectosymbiontes situés sur la lame branchiostège du céphalothorax de la crevette <i>Rimicaris exoculata</i> mâle de la nasse	p.233

AVANT PROPOS

Cette thèse a été effectuée dans le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE, UMR6197) au centre Ifremer de Brest, au sein du groupe « Interactions et Symbioses », sous la direction de Marie-Anne Cambon-Bonavita et au Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine (LBCM, EA3884) à Lorient sous la direction d'Alexis Bazire. Le sujet de cette thèse portait sur l'étude de l'interaction entre la crevette *Rimicaris exoculata* et ses épibiontes bactériens vivant au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes.

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont des écosystèmes dépourvus de lumière où la photosynthèse est remplacée (en tant que système primaire de production d'énergie) par un processus bioénergétique basé sur l'utilisation de composés chimiques par des microorganismes : la chimiosynthèse. Ces microorganismes sont qualifiés de chimiolithoautotrophes et constituent dans ces écosystèmes (comme les végétaux à la surface de la Terre) les principaux producteurs primaires. La plupart des organismes supérieurs hydrothermaux (ex. : vers tubicoles, crevettes, moules) vont vivre en symbiose avec ces microorganismes. Plusieurs types de symbioses existent, que le symbionte microbien vive dans (endosymbiose) ou sur l'hôte (épibiose), le bénéfice principal est généralement d'ordre trophique (nutritionnel).

Ce manuscrit va présenter une étude focalisée sur l'étude d'une épibiose entre des microorganismes et un crustacé endémique des sources hydrothermales de la Ride Médio-Atlantique (MAR), la crevette *Rimicaris exoculata* (Williams and Rona 1986). Ce crustacé représente l'espèce majoritaire de nombreux sites hydrothermaux de la Ride-Médio-Atlantique (MAR). Sur les sites colonisés, les crevettes vivent en agrégats denses et mobiles sur les édifices hydrothermaux, avec une densité pouvant atteindre 2500 individus / m² (Segonzac 1992). Une des particularités anatomiques de *R. exoculata* est de présenter un céphalothorax hypertrophié à l'intérieur duquel se développent des communautés microbiennes épibiotiques très denses. Elle possède également une communauté bactérienne inféodée au tractus digestif (Zbinden et Cambon-Bonavita 2003, Durand et al., 2010). Ces communautés sont renouvelées très régulièrement (tous les dix jours) lorsque la crevette mue (Corbari et al., 2008a, 2008b). En 1995, une première étude mettait en évidence à partir d'individus du site Snake Pit de la MAR que ces épibiontes appartenaient à un seul groupe

bactérien : les *Epsilonproteobacteria* (Polz et Cavanaugh 1995). Cependant, des travaux ont montré la présence d'autres phylotypes tels que les *Gammaproteobacteria* et *Zetaproteobacteria* qui sont couramment impliqués dans des relations symbiotiques avec des invertébrés hydrothermaux (Zbinden et al., 2008, Petersen et al., 2009, Hügler et al., 2011, Jan et al., 2014).

Une étude récente a démontré le rôle trophique des symbiontes pour la crevette avec un transfert de matière organique principalement par voie transcuticulaire au niveau du céphalothorax (Ponsard et al., 2013). Une étude récente a ensuite été menée sur le métagénome des symbiotes du céphalothorax (Jan et al., 2014) et a permis de confirmer les hypothèses précédentes concernant les métabolismes microbiens (oxydation du fer, du méthane et de l'hydrogène et oxydation / réduction des composés soufrés) présents au sein des génomes de la communauté bactérienne symbiotique du céphalothorax de *R. exoculata* (Zbinden et al., 2008; Hügler et al., 2011; Petersen et al., 2011; Guri et al., 2012; Ponsard et al., 2013). Un schéma métabolique a pu ainsi être reconstruit pour chacune des deux principales classes d'épibiontes, les *Epsilon*- et *Gammaproteobacteria*. L'ensemble des gènes métaboliques mis en évidence indique que ces épibiontes sont capables d'utiliser de multiples donneurs et accepteurs d'électrons et, sans doute, d'adapter leur métabolisme en fonction des variations environnementales. Ils seraient également capables de s'adapter aux fluctuations de température et aux divers stress liés à l'hydrothermalisme (mise en évidence notamment de gènes codant pour des protéines Hsp). De plus, des gènes connus pour être impliqués dans les interactions hôtes-symbiontes (Quorum Sensing, attachement aux surfaces) ont également été identifiés. Cependant les mécanismes permettant aux symbiontes de coloniser de manière spécifique certaines parties du céphalothorax reste encore inconnus.

A ce jour rien n'est connu concernant les modes de reconnaissance entre *Rimicaris exoculata* et ses deux communautés microbiennes associées, distinctes entre elles et de l'environnement. La présence des symbiontes filamenteux très localisés et non septés entre les microvillosités des cellules épithéliales saines du mésentéron, laisse supposer un contrôle de la division/prolifération cellulaire des épibiontes par l'hôte. De même, au niveau de la cavité céphalothoracique, les symbiontes sont strictement localisés sur certaines pièces buccales et ne sont jamais retrouvés au niveau des branchies, pourtant situées dans la même cavité. Enfin, la diversité retrouvée au sein de ces deux communautés symbiotiques est faible ce qui suppose, soit une sélection depuis l'environnement dans le cas d'une transmission horizontale, soit une sélection depuis une communauté initiale si les symbiontes sont transmis

de manière verticale. Il existe donc probablement un mode de reconnaissance et de contrôle strict à ce niveau, permettant la recolonisation à l'identique après chaque mue.

L'objectif principal de ces travaux est de rechercher des mécanismes pouvant jouer un rôle clé dans la mise en place d'une colonisation microbienne sélectionnée et contrôlée, stable dans le temps et l'espace chez *Rimicaris exoculata*. Les travaux de cette thèse sont donc principalement concentrés sur l'étude des épibiontes associés au céphalothorax de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* au cours de son cycle de mue.

Je commencerai par introduire dans un premier chapitre le sujet en décrivant sur des notions allant du parasitisme à la symbiose en insistant particulièrement sur les modes de transmissions et la régulation de la symbiose, et poursuivrai par la présentation des écosystèmes hydrothermaux, milieu de vie du modèle pour finir au modèle de l'étude qu'est *R. exoculata*. Les résultats de cette thèse vont être ensuite présentés en deux parties :

- **Chapitre 3** : Mise en évidence de gènes *lux* du Quorum Sensing et de leur expression chez la communauté épibiontique de la crevette *Rimicaris exoculata*. Utilisation possible comme marqueurs de biogéographie (Article en révision à PloS ONE).
- **Chapitre 4** : Identification de la Re-crustine, peptide antimicrobien impliqué dans l'ectosymbiose de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*. (Article en préparation).

Finalement, les résultats de ces travaux seront synthétisés et des axes de recherches futures seront discutés dans une partie bilan et perspectives.



Chapitre 1

Introduction



I. La symbiose dans le monde vivant

La première définition de la symbiose remonte à la fin du 19^{ème} siècle. Elle désigne le fait pour deux organismes distincts de vivre ensemble (De Bary 1879). Elle englobe alors tous les types d'interactions durables, sans considérer la notion de bénéfice des partenaires ou l'aspect physiologique de l'association. Ainsi le parasitisme (où l'un des partenaires tire bénéfice de l'association au détriment de l'autre) et le mutualisme (bénéfice partagé des partenaires) sont des associations symbiotiques au sens large. La symbiose au sens strict prend en compte la notion de bénéfices des partenaires. Elle est parfois distinguée du mutualisme par l'aspect physiologique et l'acquisition au cours du cycle de vie, la symbiose étant considérée comme une association plus intégrée que le mutualisme. Une variété de définitions existe, qui dépendent bien souvent du point de vue des scientifiques qui les emploient en introduisant des limites ou des biais. Dans la suite du manuscrit, le terme symbiose sera utilisé en respectant la définition de Sélosse (Sélosse, 2000) soit une « *coexistence durable de deux organismes, à bénéfice mutuel* », définition la plus usitée dans la nomenclature courante. Au sein de l'association, le partenaire le plus grand est appelé hôte, et le(s) plus petit(s), symbionte(s) (Smith et Douglas, 1987).

Lors de la mise en place d'une symbiose, les symbiontes peuvent se comporter comme des parasites (la pénétration dans les tissus de l'hôte par des systèmes de sécrétion de type III en est un exemple) ; puis ils vont être sélectionnés positivement ou négativement par l'hôte selon leurs apports, et les avantages ou inconvénients qu'ils généreront pour celui-ci (Tableau 1). Les symbiontes peuvent ainsi être considérés comme des parasites sélectionnés positivement selon certaines conditions (physico-chimiques par exemple), et le(s) rôle(s) qu'ils peuvent tenir (tel que la nutrition ou la détoxification). Les associations symbiotiques sont généralement caractérisées selon plusieurs critères :

- La spécificité de l'association : elle est déterminée par le nombre d'espèces avec lesquelles un organisme donné peut établir une association symbiotique durable.
- La durée de l'association : les symbioses peuvent avoir des durées variables et être limitées à une partie seulement du cycle de vie d'un organisme (par exemple, à l'âge adulte uniquement).
- Le caractère obligatoire ou facultatif de l'association : une symbiose est dite obligatoire si au moins un des partenaires est dépendant de cette association pour vivre. Si ce

n'est pas le cas, elle est dite facultative. L'hôte vivant sans symbionte est dit aposymbiotique et le symbionte non associé à son hôte est dit « sous forme libre ».

– La localisation au niveau de l'hôte : une **ectosymbiose** désigne une symbiose où le symbionte vit au contact de la paroi externe des tissus de son hôte, et donc en dehors des cellules de l'hôte. Lorsque le symbionte est localisé dans les tissus de l'hôte, on parlera d'**endosymbiose**. L'endosymbiose peut être extra- ou intracellulaire lorsqu'il pénètre dans une cellule de l'hôte (Sélosse, 2000). La zone de contact entre les partenaires correspond à une interface non seulement d'adhésion, mais également d'échanges entre les partenaires, où peuvent s'établir les mécanismes de communications cellulaires. Ces échanges sont plus ou moins importants selon le degré d'intégration de la symbiose.

– Les échanges entre les partenaires. Il s'agit le plus souvent d'échanges d'ordre trophique et de nombreux exemples existent tels que : les microorganismes hétérotrophes du rumen des bovins qui dégradent la cellulose des graminées en composés carbonés assimilables par ces derniers (Halliwell et Bryant, 1963 ; Teather et Wood, 1982 ; van Gylswyk, 1990) ; ou bien les *Rhizobium* (procaryotes du sol) qui captent l'azote gazeux pour le transmettre à des légumineuses (plantes) (Fisher et Long, 1992 ; van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Un autre rôle possible des symbiontes est celui de détoxification ; citons alors le cas de la symbiose intestinale de l'isopode marin *Limnoria tripunctata* qui va être colonisé par des microorganismes détoxifiants lorsqu'il se nourrit sur du bois traité à la créosote (pesticide) (Zachary et Colwell, 1979 ; Zachary et al., 1983).

– Le mode de transmission des symbiontes est considéré comme l'un des critères les plus importants, car une symbiose démarre par l'acquisition des symbiontes pour un hôte et se pérennise par la transmission à chaque génération. Ces événements font appel à des processus souvent complexes de reconnaissance impliquant de nombreux gènes.

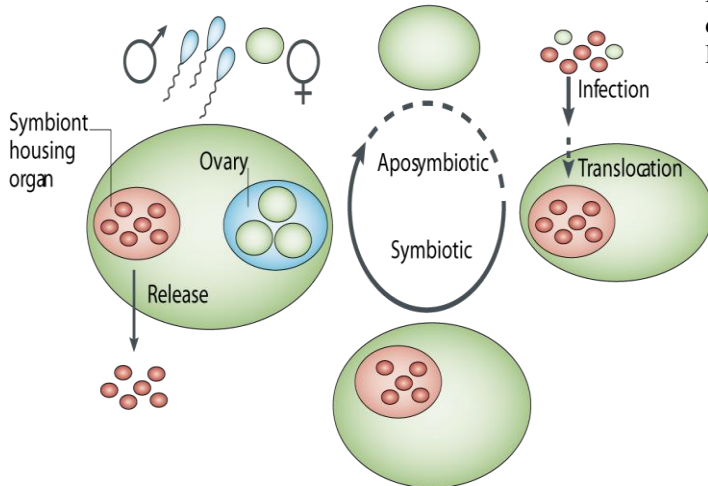
Tableau 1. Type d'interactions entre individus au sein d'un écosystème (Sélosse 2000)

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

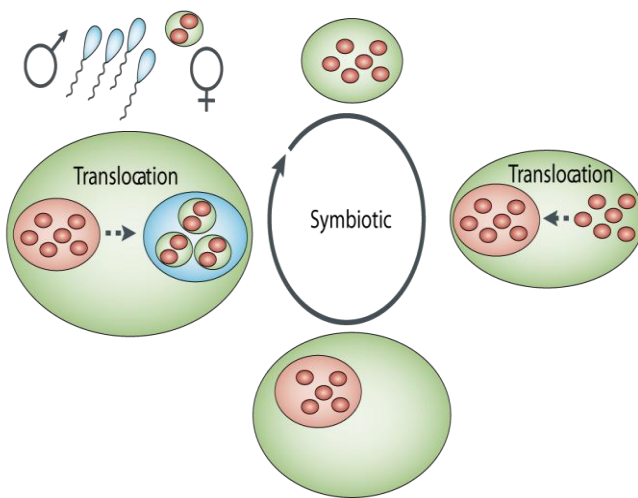
1. Mode de transmission des symbiontes microbiens

Le mode de transmission des symbiontes a été le premier processus identifié pour comprendre l'évolution des associations symbiotiques (Lipsitch et al., 1995). La transmission peut être **horizontale** ou **verticale** (Figure 1). La transmission horizontale est définie comme une transmission depuis l'environnement. La transmission verticale se produit au contraire de parents à descendants. Elle a une conséquence majeure : elle lie le cycle de vie des partenaires avec la cotransmission de leur patrimoine génétique. Ainsi, si un symbionte induit un très fort coût sur son hôte, il limite directement sa propre transmission. Au contraire, un symbionte qui procure un bénéfice à son hôte verra sa propre transmission augmentée et sera sélectionné.

a Horizontal transmission from the environment



b Vertical maternal transmission



c Vertical maternal transmission with occasional host switching

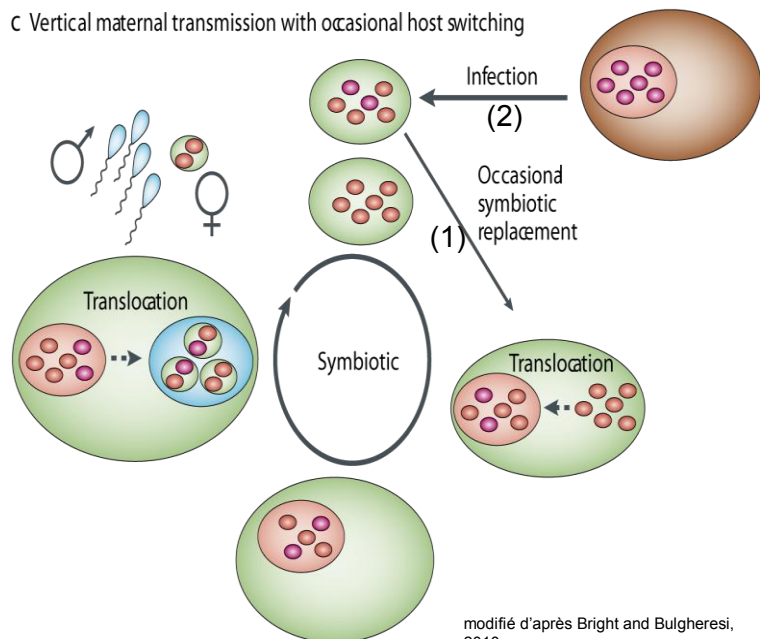


Figure 1 : Les différents modes de transmission des symbiontes microbiens, (modifié d'après Bright et Bulgheresi, 2010).

a. **Transmission horizontale via l'environnement.**

La reproduction de l'hôte conduit à former des descendants aposymbiotiques (sans symbionte), lesquels vont être colonisés à un certain stade de leur cycle de vie par des symbiontes présents dans l'environnement ; souvent les symbiontes peuvent être transférés depuis le site initial de contact avec l'hôte jusqu'à un organe spécialisé dans l'hôte (« symbiont housing organ » ou bactériome); parfois une libération des symbiontes dans l'environnement à partir de l'hôte adulte se produit.

b. **Transmission verticale à travers une lignée germinale femelle.**

Les symbiontes sont généralement transférés depuis un organe spécialisé dans l'hôte (« symbiont housing organ » ou bactériome) jusqu'aux gonades femelles, il va donc se créer des descendants symbiotiques ; souvent les symbiontes sont transférés depuis leur site de colonisation jusqu'à l'organe spécialisé dans l'hôte (« symbiont housing organ »).

c. **Mode de transmission multiple.**

Une transmission verticale avec occasionnellement une transmission horizontale par commutation d'hôte (« host switching ») peut se produire. Au cours d'une transmission verticale, le transfert horizontal occasionnel de nouveaux symbiontes (en magenta) depuis une population d'hôtes de la même espèce (1), depuis d'autres espèces (en brun) (2), ou depuis une population de symbiontes libres dans l'environnement (non montré ici) peut survenir.

modifié d'après Bright and Bulgheresi, 2010

1.1 Transmission verticale

La transmission verticale se produit de parents à descendants. Dans certains cas, il n'y a pas de phase aposymbiotique, donc l'association est permanente entre les partenaires (cas du pou *Pediculus humanus* (Figure 2a). Plus couramment, dans ce type de transmission, une longue phase symbiotique suit une courte phase aposymbiotique (cas du bryzoaire *Bugula neritina* (Figure 2b). La transmission démarre au niveau des œufs. En fonction du couple, elle peut se produire durant les différentes étapes embryonnaires (cas d'une ascidie *Trididemnum miniatum* et des aphides *Acrytosiphon pisum* et *Brevicoryne brassicae*) jusqu'au stade larvaire (larve toujours associée au parent, cas de la mouche tsé-tsé *Glossina morsitans*) ou pendant le développement du juvénile à l'intérieur (cas du nématode *Heterorhabditis bacteriophora*) ou à l'extérieur (cas de la sangsue *Hirudo* spp.) de la mère. Bien que la majorité de ces associations soit obligatoire pour l'hôte, il existe des exceptions comme chez le nématode *Steinernema carpocapsae* qui peut accomplir entièrement son cycle de vie sans son symbionte, le nématode au stade juvénile peut être associé facultativement avec son symbionte *Xenorhabdus nematophila* (Herbert et Goodrich-Blair 2007) (Figure 2c).

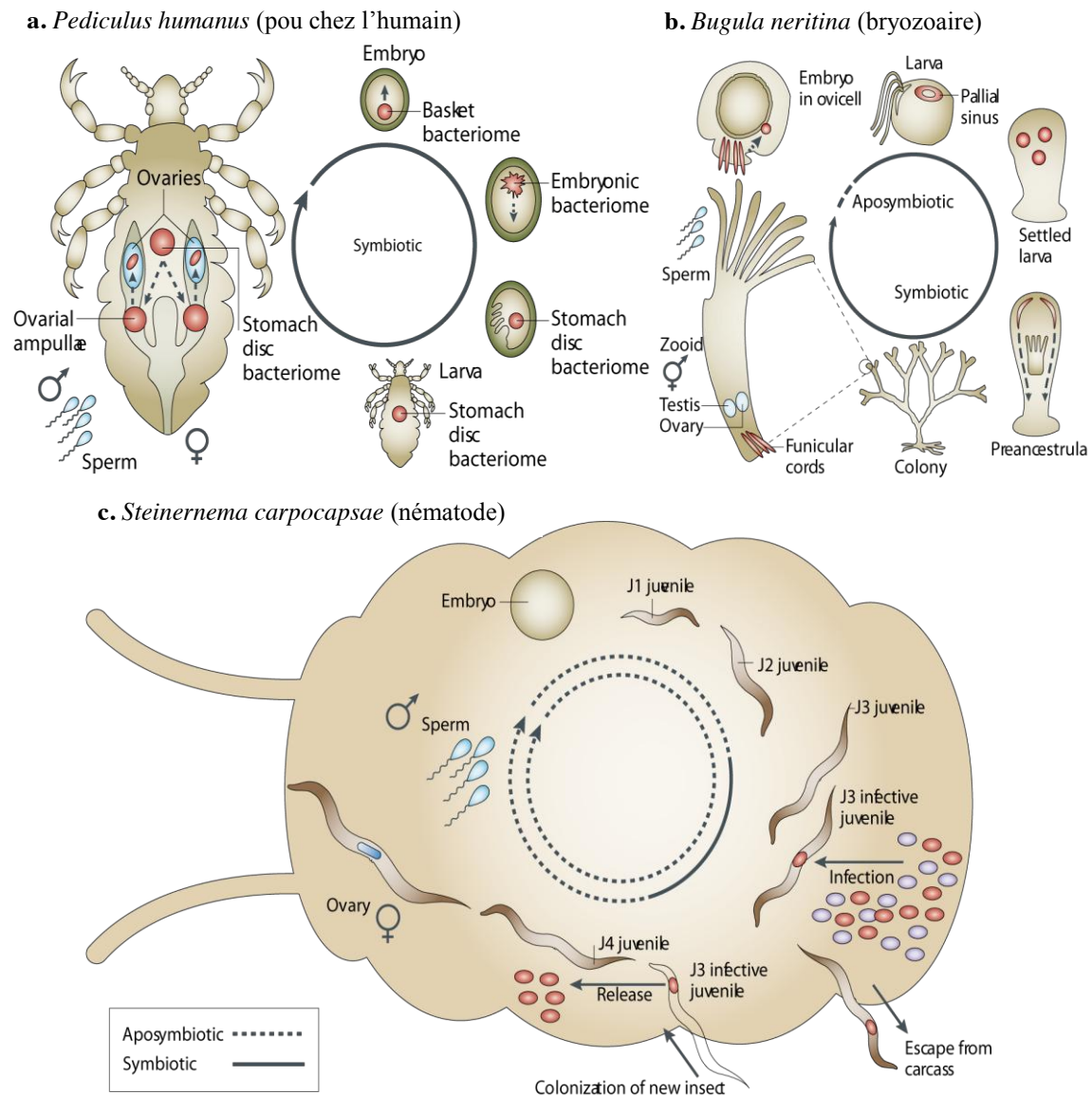


Figure 2 : Exemples de cycles de vie simplifiés d'hôtes possédant des symbiotes transmis verticalement (Bright et Bulgheresi, 2010) (les bactéries symbiotiques sont en rouge / les bactéries environnementales sont en violet).

- Le pou *Pediculus humanus* possède un symbiote intracellulaire *Candidatus RIESIA pediculicola* dans ses disques stomacaux et ses ampoules ovariennes. Les œufs pondus vont suivre un développement embryonnaire jusqu'au stade larvaire. Pendant ces processus le bactériome subit trois étapes de maturation (Eberle and McLean 1982). Il n'y a pas de phase aposymbiotique dans cette association.
- Le bryozoaire hermaphrodite *Bugula neritina* possède un endosymbiote extracellulaire *Candidatus Endobugula sertula* dans ses cordons funiculaires au stade adulte et dans son sinus palléal au stade larvaire. La fécondation interne résulte du transfert du zygote dans l'ovicell, dans lequel les endosymbiotes vont venir se développer. Les larves libérées vont se fixer et se développer. Pendant la métamorphose en preancestrula et ancestrula, les symbiotes migrent vers les cordons funiculaires (Sharp *et al.*, 2007). Il y a une phase aposymbiotique très courte caractéristique des transmissions verticales.
- Le nématode *Steinernema carpocapsae* (parasite de nombreux insectes) possède un symbiote, *Xenorhabdus nematophila*, transmis de manière « pseudo-verticale ». Les symbiotes sont libérés depuis les vésicules dans un nouvel insecte hôte en passant de l'intestin au sang de l'insecte, où ils vont se reproduire et tuer l'insecte (Herbert and Goodrich-Blair 2007, Hügler *et al.*, 2011). Cette transmission est dite « pseudo-verticale » car plus d'un nématode peut être trouvé à l'intérieur d'un seul insecte, et donc les symbiotes transmis à la descendance peuvent provenir soit des parents (vertical), soit d'autres nématodes présents (« host switching »). L'hôte peut réaliser un cycle complet de manière aposymbiotique.

Les symbiontes acquis verticalement sont souvent transmis à travers les lignées germinales femelles (voie transovarienne) pour les animaux à sexes séparés et hermaphrodites. La transmission verticale est rarement la seule voie utilisée pour le transfert des symbiontes à la génération suivante. Généralement, les études phylogénétiques montrent que l'acquisition verticale est dominante avec un transfert horizontal occasionnel inter-, intra-espèces ou depuis l'environnement. C'est le cas par exemple pour les insectes colonisés par *Wolbachia* spp. (DeWayne Shoemaker et al., 2002) et également pour quatre genres d'ascidies associées à la cyanobactérie *Prochloron* spp. (Munchhoff et al., 2007). Chez l'insecte *Frankliniella occidentalis* le symbionte bactérien intestinal du genre *Erwinia* est transmis verticalement par l'intermédiaire des fèces (trophallaxie) et/ou par régurgitation des congénères hôtes sur les larves aposymbiotiques venant d'éclore (De Vries et al., 2004). Dans le cadre d'une transmission verticale, les moyens de reconnaissances mis en œuvre pourraient être moins complexes que pour une transmission horizontale, mais tout aussi importants (*cf* section I.2)

1.2 Transmission horizontale

Dans ce mode de transmission, il y a une phase dite aposymbiotique (avant l'acquisition du symbionte) et une phase symbiotique de l'hôte qui sont intrinsèques à son cycle de vie (Figure 3a). Chez l'hôte animal, la phase aposymbiotique inclut les cellules germinales (œufs et sperme) et le développement embryonnaire. Généralement dans le cas des symbioses en milieu marin, les larves sont également aposymbiotiques durant leur phase de dispersion pélagique (cas des vers tubicoles, des lucinidés, des moules *bathymodiales*) (Bright et Bulgheresi 2010). Pour les bactéries transmises horizontalement, la vie symbiotique est facultative et une population libre dans l'environnement sert d'inoculum pour la symbiose. Dans les environnements marins, ces populations sont retrouvées au niveau des sédiments (West et Adams 1997; Costa et al., 2001), dans les zones pélagiques (Lee et Ruby 1992; Gros et al., 2003; Aida et al., 2008) et dans les zones abyssales (Harmer et al., 2008). Dans certains cas, l'hôte adulte peut libérer ses symbiontes dans l'environnement à proximité de sa descendance (Kiers et al., 2003; Salerno et al., 2005).

Pour établir cette association, les deux partenaires libres doivent rentrer en contact, au bon moment, au bon endroit et doivent réitérer cette opération à chaque génération. La rencontre est souvent restreinte à une phase précise du cycle de vie de l'hôte, phase larvaire

pour les vers tubicoles (*Riftia pachyptila*) (Figure 3b), juvénile pour les bivalves (*Bathymodiolus azoricus*) et les calamars (*Euprymna scolopes*) (Figure 3a). Par exemple, les symbiontes bactériens méthanotrophes du ver *Siboglinum poseidoni* vont être ingérés par la bouche ou par l’anus seulement durant la phase larvaire (Callsencencic et Flugel 1995).

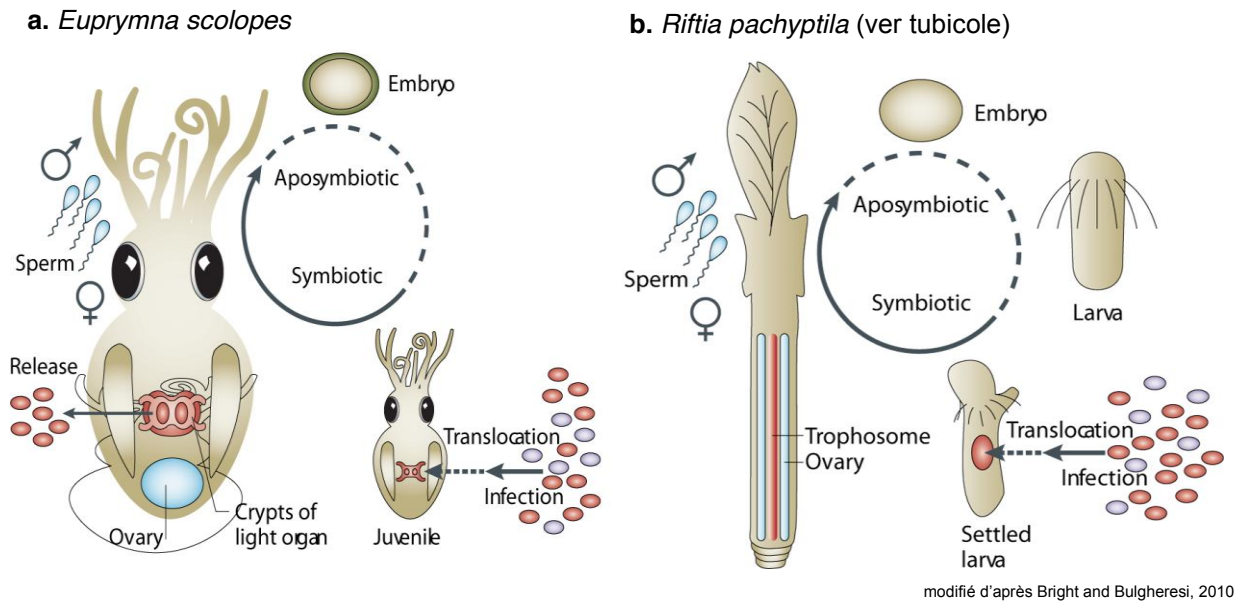


Figure 3 : Exemples de cycles de vie simplifiés d’hôtes possédant des symbiontes transmis horizontalement (Bright et Bulgheresi, 2010) (les bactéries symbiotiques sont en rouge et les bactéries environnementales sont en violet).

- Le calamar *Euprymna scolopes* et son endosymbionte extracellulaire *Vibrio fischeri* colonisant les cryptes des organes lumineux de son hôte. Les hôtes mâle et femelle se reproduisent, les œufs sont libérés dans l’environnement et deviennent des juvéniles aposymbiotiques. *V. fischeri* en phase libre dans l’environnement est spécifiquement sélectionné et la colonisation de l’organe lumineux est complète au bout de 12 heures seulement après éclosion (Nyholm and McFall-Ngai 2004).
- Le vestimentifère *Riftia pachyptila* et son endosymbionte intracellulaire *Candidatus Endoriftia persephone* localisé dans le trophosome (ou bactériome) de l’hôte. Les mâles libèrent leur sperme dans l’environnement qui migre vers les femelles, où les œufs sont fécondés ; le zygote est libéré dans la colonne d’eau, il se disperse et se développe en larve qui se fixe. A ce moment, la métamorphose est initiée. Les symbiontes se fixent sur l’épiderme de la larve, puis migrent à travers le mésoderme entourant l’intestin, engendrant le développement du trophosome (Nussbaumer *et al.*, 2006).

Dans beaucoup de systèmes, le moment de la rencontre entre les partenaires peut être modifié expérimentalement. Par exemple, la pénétration d’endosymbiontes bactériens sulfo-oxydants dans l’épithélium des branchies du lucinidé *Codakia orbicularis* se produit généralement après la métamorphose, mais peut être artificiellement reportée de quelques mois en cultivant la phase juvénile aposymbiotique de l’hôte en milieu stérile (Gros *et al.*, 1998). La rencontre peut être également limitée dans l’espace. Même en l’absence de structures spéciales chez l’hôte (bactériocytes), le contact peut être restreint à des zones spécifiques, telles que la région du tronc chez les larves de vers tubicoles (Nussbaumer *et al.*,

2006) ou les branchies (et quelquefois une partie de l'épithélium du manteau) chez les bivalves (Salerno et al., 2005).

L'une des entrées les plus répandues est la voie orale. Les symbiontes accèdent à leur hôte *via* les particules ingérées et peuvent coloniser l'épithélium de l'intestin. Par exemple, le poisson-zèbre *Danio rerio* acquiert ses symbiontes intestinaux par ingestion orale d'eau de mer juste après éclosion (Bates et al., 2006). Une fois dans l'intestin, les mouvements péristaltiques peuvent améliorer le contact des symbiontes avec l'épithélium. D'autres bactéries suivent les gradients chimiques en nageant (utilisation de flagelles) ou en utilisant des mécanismes dits de « gliding » (déplacement sans flagelles, (McBride 2001)). Le métagénome du symbionte bactérien *Candidatus Endoriftia persephone* dont l'hôte est le ver tubicole *R. pachyptila* présente de nombreux gènes corrélés à la chimioréception et la mobilité, suggérant que les symbiontes en phase libre pourraient reconnaître et se déplacer vers leurs hôtes respectifs par chimiotaxie (Robidart et al., 2008).

Les milieux aquatiques sont par nature turbulents, il peut être difficile pour un hôte de rencontrer son symbionte. De plus, ces milieux ont généralement une faible concentration de symbiontes potentiels (Gros et al., 1996 ; Ruby et Lee 1998). De ce fait, de nombreux hôtes aquatiques vont pomper activement l'eau à travers leurs tissus augmentant ainsi leurs chances de piéger des symbiontes potentiels. Par exemple, les courants d'eaux générés par l'ouverture et la fermeture des bivalves facilitent la rencontre entre des symbiontes potentiels et l'épithélium branchial (Bright et Bulgheresi 2010). Les nouveau-nés du calamar *E. scolopes* capturent leurs symbiontes *V. fischeri* seulement s'ils se trouvent très proches des appendices ciliés de l'organe lumineux en développement. Ceci est possible grâce à la contraction du manteau et par la génération d'un micro-courant par les cils de l'animal (Nyholm et McFall-Ngai 2004). Dans le cadre d'une transmission horizontale, pour qu'un hôte rencontre son (ou ses) symbionte(s) spécifique(s), il faut des moyens de reconnaissances et des systèmes de fixation élaborés (*cf* section I.2).

2. Les moyens de reconnaissances et d'attachements hôte – symbiontes microbiens

La première étape essentielle à l'établissement d'une symbiose est le recrutement bilatéral de l'hôte et du symbionte. Cette reconnaissance très spécifique est certainement le résultat d'une longue histoire évolutive commune entre la bactérie et son hôte. Des systèmes de régulation doivent ensuite être mis en place afin d'assurer le bon déroulement de la

symbiose et la non-prolifération des bactéries. Tous ces événements nécessitent la mise en place d'un dialogue complexe et constant entre les bactéries symbiotiques et les cellules de l'hôte. Peu de choses sont encore connues sur les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la reconnaissance et l'acquisition des symbiontes par l'hôte. L'exemple de la reconnaissance entre plantes légumineuses et bactéries du *Rhizobium* est à l'heure actuelle le mieux décrit (Perret et al., 2000 ; Gage, 2004).

2.1. Acquisition héréditaire

Dans le cas des transmissions verticales, les symbiontes sont dits obligatoires et n'ont pas besoin d'être sélectionnés depuis une population environnementale. Les molécules de surface pour la reconnaissance entre partenaires ne sont pas donc pas nécessaires. Dans le cas des transmissions horizontales, les molécules de surface de type lectines ont un rôle central dans la reconnaissance entre partenaires (section 2.2.1). Cependant, actuellement une seule symbiose transmise verticalement dans laquelle les lectines ont également une importance majeure a été mise en évidence : entre une plante aquatique, *Azolla* sp. et une cyanobactérie, *Anabaena* spp. (Adams et Duggan 2008).

Pour les symbiontes transmis verticalement, les moyens de reconnaissances sont moins élaborés que pour des symbiontes transmis horizontalement, mais leur parcours est quant à lui plus complexe. Les symbiontes vont devoir parcourir deux trajets distincts, le premier dans l'hôte (bactériomes vers organes reproducteurs), le second dans la descendance hôte (des cellules indifférenciées vers les bactériomes). Dans de nombreux cas, les systèmes de sécrétions (type T3SS) jouent un rôle clé dans la colonisation (ou l'infection) des cellules de l'hôte lors d'une transmission verticale. Des auteurs ont montré que sans T3SS, *S. glossinidus* ne peut pas pénétrer dans les cellules de l'insecte hôte (*in vitro*) et ne peut donc pas être transmis verticalement, même si on l'injecte directement dans le thorax de l'insecte au stade adulte (Dale et al., 2002). Chez *P. luminescens*, un T3SS est utilisé pour sécréter une protéine (YopT) qui a une activité anti-phagocytaire, mais il n'est pas possible de conclure que le système de sécrétion soit indispensable pour la colonisation de l'hôte (nématode) (Brugirard-Ricaud et al., 2005).

Les transmissions verticales impliquent donc des stratégies qui permettent d'intégrer les symbiontes dans la reproduction et le développement biologique de l'hôte. Les mécanismes moléculaires montrent que ces intégrations ne sont pas dirigées uniquement par les hôtes. En

effet, les systèmes d'origine bactérienne comme les T3SS apparaissent comme essentiels dans le dialogue entre les partenaires symbiotiques.

2.2 Acquisition environnementale

Dans le cas d'une transmission horizontale dans un système hôte - symbiontes microbiens, le contact initial se fait généralement par l'intermédiaire d'un mucus sécrété par l'hôte (Hooper et Gordon 2001). Le mucus peut couvrir des surfaces planes, mais peut également se développer entre des structures ciliées sur le corps de l'animal (ex. : chez certains bivalves et calamars (Dubilier et al., 2008) et au niveau de microvillosités intestinales (intestin des vertébrés (Sonnenburg et al., 2004) et également sur les œufs (Giltunes et Fenical 1992). La qualité et la quantité du mucus peuvent être sous contrôle microbien. Par exemple, les symbiontes environnementaux stimulent la production du mucus qui recouvre les appendices de l'organe luminescent du calamar *E. scolopes* juvénile (Nyholm et McFall-Ngai 2004). Similairement, les résidents de l'intestin des vertébrés peuvent stimuler l'excrétion de mucus (Sonnenburg et al., 2004). Pour les symbiontes bactériens, la fixation à la surface de l'hôte implique généralement des appendices protéiques de surface très bien connus : les pili (ou frimbriae). La perte de fonction (par mutation) du gène *pilA*, qui code une protéine similaire à la piline de type IV-A, affecte la colonisation de *V. fischeri* chez le calamar *E. scolopes* (Stabb et Ruby 2003).

Dans le mucus, les partenaires peuvent s'attacher en utilisant des molécules de surface qui vont promouvoir leur fixation. Ces molécules chez l'hôte sont souvent présentes sous forme de protéines glycosylées. Le nématode marin *Laxus oneistus* produit une protéine de type lectine retrouvée dans le mucus sécrété sur tout le corps de l'animal, excepté au niveau de la tête. Cette protéine possède un domaine de reconnaissance spécifique des hydrates de carbones (sucres), permettant l'identification et le recrutement de symbiontes sulfo-oxydants. De plus, ce récepteur est similaire aux cellules dendritiques immuno-réceptrices humaines, mettant ainsi en évidence que les relations symbiotiques sont régies par des processus fondamentaux très conservés (Bulgheresi et al., 2006). Les larves de *R. pachyptila* produisent également un mucus dans lequel des bactéries s'agglutinent avant la pénétration dans les tissus par les symbiontes spécifiques chimioautotrophes (Nussbaumer et al., 2006). Ces auteurs suggèrent que ce mucus est dérivé de glandes pyriformes sécrétant de la chitine (Gaill et al., 1992 ; Shillito et al., 1995 ; Chamoy et al., 2001). Des bactéries adhérant sur des

surfaces chitineuses sont retrouvées dans d'autres relations symbiotiques au niveau des sources hydrothermales, notamment entre le crabe *Kiwa hirsuta* et ses épibiontes bactériens (Goffredi et al., 2008). Les molécules de fixation des symbiontes bactériens dans le mucus peuvent être des exopolysaccharides (EPS) ou des lipopolysaccharides (LPS). Par exemple, des auteurs ont montré qu'une mutation des gènes impliqués dans la synthèse du LPS chez *V. fischeri* a un effet négatif sur la colonisation des organes luminescents chez le calamar (Adin et al., 2008)

Avec la reconnaissance et la fixation sur l'hôte, l'autoagrégation des symbiontes bactériens entre eux est un facteur important pour la symbiose ; beaucoup de molécules de surface (EPS) et de structures mentionnées précédemment facilitent ces processus. Par exemple, le fait que *V. fischeri* s'agrège spécifiquement dans le mucus sécrété par *E. scolopes* dépend du système de transduction du signal à deux composants RscS du symbionte : il contrôle la production d'EPS I par régulation de l'opéron *syp* (Yip et al., 2006 ; Husa et al., 2007). De plus, l'induction de mutations sur le système de Quorum Sensing AinS-AinR réduit la vitesse de colonisation de *V. fischeri*, probablement en raison d'une mobilité flagellaire insuffisante (Visick et Ruby, 2006). La règle dans les transmissions horizontales est que la reconnaissance hôte - symbionte(s) se fait généralement dans le mucus sécrété par l'hôte. Néanmoins, concernant les symbioses chez les plantes, la reconnaissance peut commencer à distance par la libération dans le milieu, au niveau des racines, de molécules (flavonoïdes) reconnues par les symbiontes bactériens (*Rhizobium*). Ces molécules activent chez la bactérie le facteur de transcription NodD qui permet principalement la synthèse et la libération des facteurs de nodulation (Cooper 2004, 2007).

II. Régulations des populations symbiotiques

Dans le cas d'une ectosymbiose la formation d'un biofilm (Figure 4) joue un rôle important dans l'installation et le maintien des symbiontes, comme par exemple chez le calmar *Euprymna scolopes* ou les symbiontes du tube digestif des mammifères (Sonnenburg et al., 2004 ; Yip et al., 2006). Un biofilm peut être défini comme une agrégation d'un ou plusieurs groupes de micro-organismes différents, intégrés dans une matrice et adhérant à une surface. Les biofilms sont omniprésents. Les bactéries peuvent les former sur une grande variété de surfaces, biotiques ou abiotiques, dans des milieux naturellement humides, mais aussi dans des conditions de vie les plus extrêmes. Des études récentes ont décrit des biofilms

bactériens retrouvés à des températures négatives extrêmes dans les eaux de l'Antarctique (-12°C), mais aussi dans les eaux thermales allant de 35°C à 50°C , des conditions d'acidité extrême, dans des milieux en teneur en métal élevée ou pauvres en nutriments (Campos et al., 2009 ; Yang et al., 2009). Les colonies bactériennes représentent environ 15 à 20% du volume d'un biofilm tandis que le reste est composé d'une matrice d'EPS dans laquelle les colonies sont incorporées. La matrice d'EPS est constituée d'un mélange de différents polymères naturels, principalement des polysaccharides, mais aussi d'une variété de protéines, des glycoprotéines, des glycolipides, ainsi que d'acides nucléiques (Flemming et al., 2007). Cette matrice environnante a plusieurs rôles importants dans la vie de ses habitants. Elle représente une sorte de refuge pour les colonies bactériennes, agissant en tant que bouclier contre des changements parfois extrêmes de conditions environnementales. On comprend alors mieux pourquoi les bactéries adoptent majoritairement un mode de vie en biofilms plutôt que sous la forme d'organismes planctoniques (Watnick et al., 2000 ; Flemming et al., 2010).

La formation d'un biofilm est en partie régulée par un système de communication bactérien dépendant de la densité de la population appelé Quorum Sensing (QS) (Henke et al., 2004 ; Xavier et Bassler, 2003 ; Nyholm et al., 2004, Visick et al., 2006 ; Eberl et al., 2011 ; Pérez et al., 2011 ; Shiner et al., 2005).

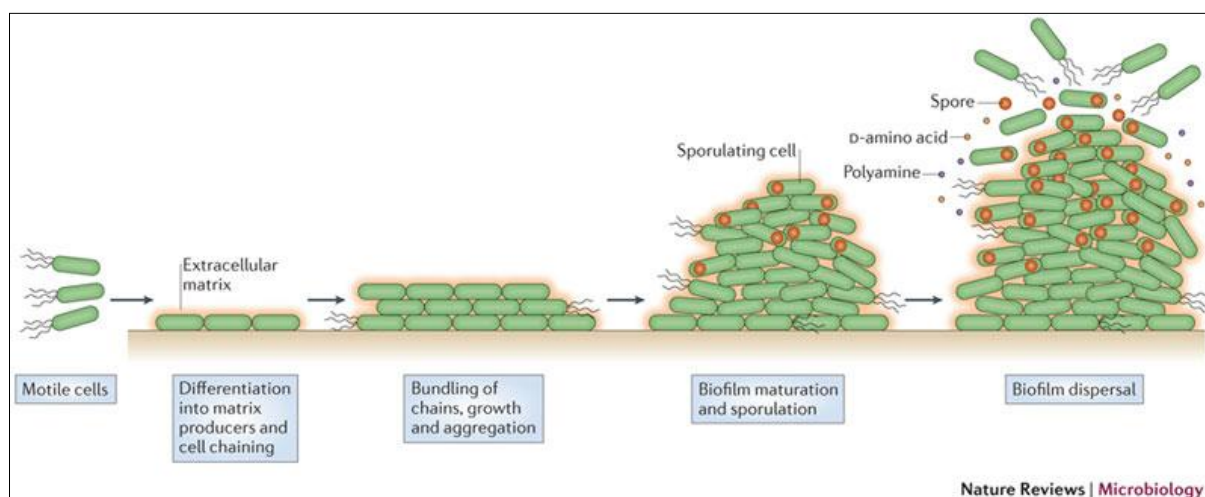


Figure 4 : Cycle de vie d'un biofilm chez *Bacillus subtilis*

Les bactéries rencontrent une surface sur laquelle elles se fixent seules ou par îlots de colonisation. Puis s'ensuit une division cellulaire importante qui permet l'extension de la colonie et la formation d'un tapis microbien. Ceci s'accompagne de la production et l'excrétion de substances polymériques extracellulaires visqueuses (exopolysaccharides ou EPS). La production d'EPS permet à la communauté du biofilm émergent de développer une structure tridimensionnelle complexe qui est influencée par une variété de facteurs environnementaux. Ce développement peut se faire en quelques heures. Les biofilms peuvent ensuite se propager par le détachement de cellules. Chaque détachement permet aux bactéries de se fixer sur une surface ou à un biofilm situés en aval de la communauté d'origine (Vlamakis et al., 2013)

1. Communiquer pour mieux s'installer

Le quorum, par définition, est un nombre minimum de membres d'un certain assemblage, requis pour être présent afin de prendre une certaine décision. Le Quorum bactérien implique une concentration minimum, critique de cellules bactériennes dans une population, conduisant à l'expression commune et coordonnée de gènes en fonction de changements dans leur environnement. Le Quorum Sensing peut donc être défini comme une régulation de l'expression des gènes en fonction de la densité cellulaire de la population. Les bactéries produisent et sécrètent des molécules de signalisation chimique de type phéromones appelées autoinducteurs (Fuqua et al., 2001; Waters et Bassler, 2005). La concentration extra-cellulaire de ces molécules augmente en fonction de la densité cellulaire bactérienne. Lorsque les bactéries détectent la concentration minimale stimulatrice d'un autoinducteur donné, elles agissent en conséquence et modifient leur comportement en réponse à ce dernier. Le Quorum Sensing peut donc être divisé en 4 étapes : 1) la synthèse intracellulaire des molécules signal, 2) la sécrétion des molécules, activement ou passivement, 3) la détection de la molécule de signalisation et sa liaison à un inducteur et 4) l'activation de la transcription génique (Miller et Bassler 2001 ; Sifri, 2008). Ce mécanisme permet de contrôler de nombreux processus bactériens comme la virulence, la conjugaison, la bioluminescence, ainsi que la production d'antibiotiques et de toxines (Fuqua et Greenberg, 2002). Plusieurs types de QS ont été décrits (Figure 5).

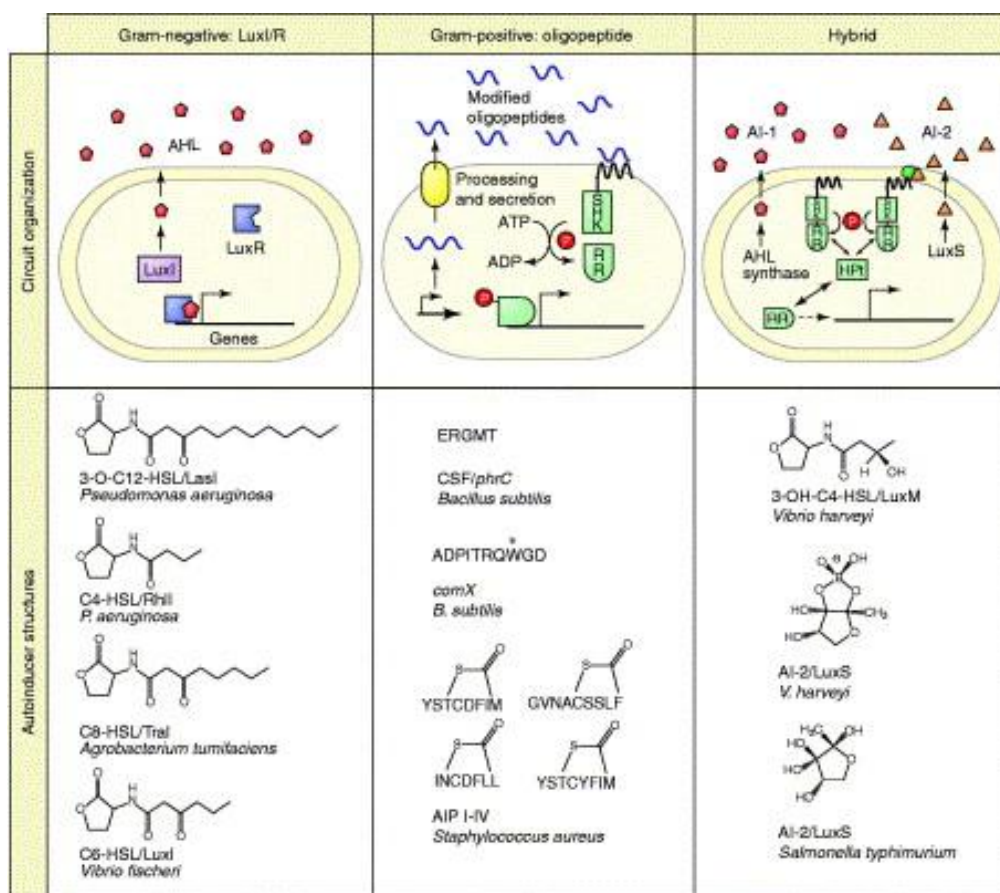


Figure 5 : Les différents systèmes de Quorum Sensing (Henke et al., 2004).

Gram négatif LuxI/R-Type (colonne de gauche), Gram positif oligopeptide type (colonne du milieu), type hybride qui possède des caractéristiques des systèmes à la fois des bactéries à Gram négatifs et à Gram positifs (colonne de droite). Les pentagones rouges indiquent les acyl-homosérines lactones (AHL) ; les vagues bleus indiquent des oligopeptides ; les triangles orange indiquent les autoinducteurs-2 (AI-2). Les structures chimiques des auto-inducteurs représentatifs sont présentées dans la 2^{ème} ligne du tableau. Un astérisque indique une modification isoprényle. Abréviations: HPT, protéines phosphotransfert histidine; P, phosphate; RR, régulateur de réponse; SHK, capteur histidine kinase

1.1 Le Quorum Sensing chez les bactéries à Gram négatif

Le Quorum Sensing (QS) a été découvert chez la bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri* (Nealson et al., 1979). *V. fischeri* colonise les organes lumineux de plusieurs poissons et calmars marins, et contrôle la production de lumière à travers l'expression d'un opéron de gènes de bioluminescence (*luxICDABEG*). L'opéron lux est régulé par la production de la molécule de signalisation N-3-oxo-hexanoyle-L-homosérine lactone (Eberhard et al., 1981). Le QS chez les bactéries à Gram négatif, implique en majorité des auto-inducteurs de type 1 (AI-1) ou acyl-homosérines lactones (AHL). Ce sont de petites molécules solubles qui, quelle que soit la bactérie productrice, possèdent un cycle lactone conservé. Elles diffèrent de par la longueur de leur chaîne acyle (4 à 14 carbones), de par leur

degré de saturation (présence ou absence de double liaison), et par la présence ou non de groupements en position 3 (cétone ou hydroxyle) (Eberl et al., 2011). La nature du message dépendra du mélange des AHL dans le milieu. Les AHL sont synthétisées dans le cytoplasme à un faible niveau basal par des enzymes de type LuxI. Ces AHL diffusent au travers de la membrane et sont accumulées dans les milieux intra et extra cellulaires. L'augmentation de la densité de population élève la concentration locale d'AHL. Bien que chaque cellule produise toujours de faibles niveaux d'AHL, dans l'ensemble, le groupe synthétise des concentrations de plus en plus élevées. Quand une concentration seuil est atteinte, les AHL traversent les membranes et se fixent sur un facteur de transcription de type LuxR. Le complexe LuxR-AHL se fixe alors sur le promoteur de gènes cibles et active leur transcription. Souvent, les gènes cibles incluent le gène codant pour l'homologue LuxI, créant un rétro contrôle positif du QS.

1.2 Le Quorum Sensing chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, le QS met en jeu des oligopeptides synthétisés sous forme de peptides précurseurs qui sont transformés, modifiés et exportés hors de la cellule à l'aide d'un système de transport ATP binding cassette (ABC). Des systèmes à deux composants (histidine kinase) permettent de détecter ces oligopeptides auto-inducteurs à une certaine concentration (Waters et al., 2005). La transduction du signal est similaire à celle trouvée chez *V. harveyi*.

1.3 La communication inter espèce : l'auto-inducteur de type 2 (AI-2)

Les bactéries Gram-négatives et Gram-positives possèdent un certain système de détection du quorum qui leur permet de communiquer au sein de leur propre espèce, et de vivre dans un biofilm complexe. Cependant la vie dans une communauté hétérogène exige une communication et une coordination de comportement dans un langage commun. L'auto-inducteur de type 2 (AI-2) représente une molécule d'auto-inducteur universel qui permet la communication entre les espèces. Ce système a été mis en évidence chez *V. harveyi* qui contrôle la bioluminescence (Nyholm et al., 2004). Il comporte deux circuits : un faisant intervenir des AHL comme pour les bactéries à Gram négatif et un basé sur l'auto-inducteur de type 2 (AI-2). Le gène *luxS* de *Vibrio harveyi* a été identifié comme le codeur de l'enzyme synthase qui produit autoinducteur-2. La transduction du signal de ces auto inducteurs AI-1 et 2 se fait par une cascade de phosphorylation qui aboutit à l'activation de régulateur de la

transcription de gènes cibles. Par la suite, des gènes présentant une similarité de séquence au gène *luxS* ont également été trouvées chez d'autres bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Surette et al., 1999 ; DeKeersmaecker et al., 2003).

1.4 La communication hôte-symbionte

Depuis la découverte du phénomène dans les années 70 et l'introduction du terme deux décennies plus tard (Nealson et al., 1970; Fuqua et Winans, 1994), nos connaissances sur le QS n'ont cessé de croître. Le QS utilise pour réguler l'expression des gènes bactériens, des composés semblables aux hormones appelées auto-inducteurs. Au cours des dernières années, de plus en plus d'études ont mis en évidence le rôle de ces molécules dans les interactions entre les bactéries et leurs hôtes eucaryotes (Hughes et Sperandio, 2008 ; Hartmann et Schikora, 2015). Ces études ont montré que les auto-inducteurs peuvent communiquer avec les cellules eucaryotes en mimant les hormones. A l'inverse, les hormones des hôtes peuvent elles aussi communiquer avec les cellules bactériennes, en utilisant les mêmes voies de signalisation du QS. Cette signalisation inter-règne joue donc un rôle important dans les relations de type symbiotiques et/ou pathogènes entre les bactéries et leurs hôtes.

1.4.1 Réponse de l'hôte aux auto-inducteurs du QS

Une grande partie des études portant sur les réponses de l'hôte au QS bactérien a été recueillie dans le domaine médical, où les molécules de QS jouent un rôle essentiel dans la pathogénicité de certaines bactéries contre les humains (Holm et Vikström, 2014), et chez les plantes (Hartmann et Schikora, 2015). Par exemple la bactérie *P. aeruginosa* forme un biofilm à l'intérieur des poumons, chez les patients atteints de fibrose kystique (FK) et les molécules oxo-C12 HSL (AHL) peuvent être détectée dans les expectorations (Smith et al., 2002). La FK pulmonaire est caractérisée par une réaction inflammatoire intense qui compromet l'organe. Les études *in vivo* ont montré que l'oxo-C12 HSL (AHL) déclenche la production d'interleukine IL-8 dans les cellules épithéliales bronchiques par l'induction des facteurs de transcription NF-kB, augmentant ainsi la réaction inflammatoire. Chez les plantes, la bactérie *Sinorhizobium meliloti* produit une AHL, la 3-oxo-C14-HSL, qui provoque des nodulations chez son hôte *Medicago truncatula* (Veliz-Vallejos et al., 2014). Une étude a montré que les AHL à chaîne courte C4- et C6-AHL produites par les bactéries formant des

biofilms sur les macroalgues vertes *Ulva* et les macroalgues rouges *Gracilaria* stimule la libération de carpospores (Singh et al., 2015). De manière intéressante ces AHLs induisent aussi chez ces macroalgues la production de protéines encore non identifiées. Dans le cas de l'utilisation de souches de *V. anguillarum*, productrices ou non d'AHL, les zoospores de l'algue verte du genre *Enteromorpha* vont se fixer uniquement sur les biofilms bactériens producteur d'AHL (Joint et al., 2002). Un résultat similaire a été rapporté pour les zoospores du macroalgue du genre *Ulva* (Tait et al., 2005) et les larves cypris de la bernache *Balanus improvisus* (Tait et Havenhand 2013) qui sont attirées par les biofilms et s'attachent préférentiellement aux biofilms bactériens producteurs d'AHL. Des molécules signal dérivées de l'hôte comme l'oxyde nitrique (NO) peuvent être détectées directement par des bactéries. En effet Wu et collaborateurs ont montré que ces molécules de stress humains peuvent être reconnues par le système de Quorum Sensing de souches de *Pseudomonas aeruginosa* et alors activer les gènes de virulence régulés par le Quorum Sensing (Wu et al., 2005). A l'heure actuelle les études portant sur des animaux ne décrivent que des réponses à OC12-HSL, qui induit une augmentation de la synthèse de l'IL-8 dans les fibroblastes pulmonaires humains (Smith et al., 2001) et l'accélération de l'apoptose dans les macrophages et les neutrophiles (Tateda et al., 2003). La perception des autres AHL par les animaux (Hughes et Sperandio 2008) reste à ce jour peu étudiée. Ceci est en contraste avec la situation décrite pour les plantes qui réagissent différemment aux différents AHL, et ne dépendent pas de l'intégrité de ces molécules contrairement aux animaux.

1.4.2 Communication de l'hôte aux bactéries

A l'inverse les bactéries peuvent être elles aussi sensibles aux hormones de l'hôte. Par exemple les souches d'*Escherichia coli* entéro-hémorragiques sont capables de détourner les hormones eucaryotes présentes dans le tractus gastro-intestinal pour activer l'expression de gènes de virulence et favoriser leur colonisation sur la muqueuse du côlon humain (Sperandio et al., 2003). Par ailleurs, les eucaryotes peuvent produire des composés désignés comme acteurs du Quorum Quenching (QQ) qui interagissent directement avec les composés du Quorum Sensing bactérien pour induire une perturbation du signal (Dong et al., 2001 ; Shiner et al., 2005 ; Grandclément et al., 2015). Ainsi certains hôtes, comme la macroalgue marine *Delisea pulchra*, interfèrent dans le Quorum Sensing de leurs agents pathogènes en produisant des furanones halogénées qui miment le signal, bloquant ainsi la communication des microorganismes (Dworjanyn et al., 1999). Un autre exemple est la souche *Salmonella*

typhimurium qui a adapté le régulateur de quorum-sensing QseC à agir comme un récepteur pour la noradrénaline produite par l'hôte et ainsi lier la régulation des gènes de virulence à la présence de l'hormone dans le tissu (Moreira et Sperandio 2012). Il semble donc exister un système de communication basé sur le quorum entre les microorganismes et leurs partenaires eucaryotes.

2. Acquisition ou Infection ?

Le maintien dans le temps de la relation symbiotique implique que les bactéries puissent survivre au contact ou à l'intérieur des cellules de l'hôte. Outre l'apport de nutriments aux symbiontes, l'hôte permet de maintenir cet écosystème microbien qui en d'autres circonstances seraient considérées comme des intrus. Néanmoins, le contrôle de la croissance des populations symbiotiques reste essentiel au maintien du bon fonctionnement de la symbiose. Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans ces mécanismes de régulations.

2.1 Le symbionte face à l'hôte

Durant leur migration, en plus des barrières physiques (cellulaires), les symbiontes doivent aussi faire face au système immunitaire de l'hôte. Le symbionte *V. fischeri* possède une catalase périplasmique qui lui permet de survivre au stress oxydatif lorsqu'il pénètre dans les organes luminescents (Davidson et al., 2004) et une porine (OmpU) permettant d'éviter la phagocytose par les hémocytes de l'hôte (Aeckersberg et al., 2001). Dans le cas des symbioses chez les plantes (Légumineuses), les symbiontes bactériens (*Rhizobium*) sont connus pour éviter la phagocytose par les cellules immunitaires de l'hôte en utilisant des protéines libérées par un système de sécrétion de type III (T3SS) (Bartsev et al., 2004) (Figure 6).

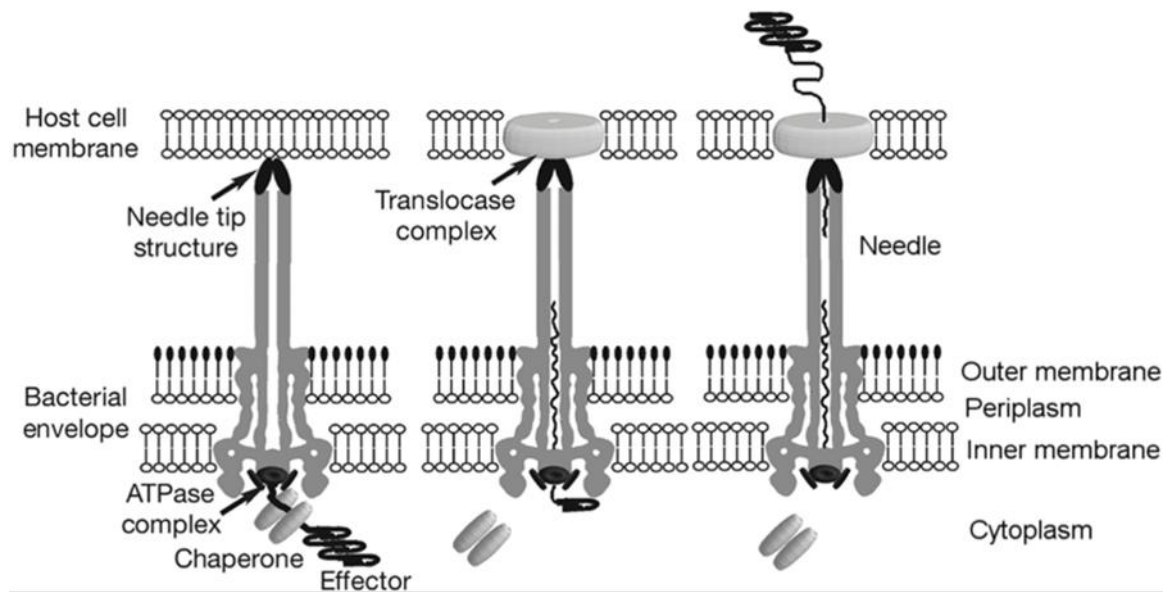


Figure 6 : Schéma représentant le fonctionnement d'un système de sécrétion de type III (T3SS). Le complexe effecteur-chaperon est reconnu par le système, auquel une ATPase est associée. L'ATPase décroche le chaperon du complexe, qui reste à l'intérieur de la cellule bactérienne et module le passage de la protéine effectrice à travers le canal central de l'aiguille. Un complexe de translocation constitué également par des protéines du T3SS est assemblé sur la membrane de la cellule hôte et module le passage des protéines effectrices à travers la membrane de l'hôte. Les effecteurs transloqués dans la cellule hôte peuvent effectuer leurs fonctions (Galan et Wolf-Watz, 2006)

Une étude a démontré l'expression d'une protéine de reconnaissance des peptide-glycanes (PRGP) dans les bactériocytes du charançon *Sitophilus zeamais*. En modifiant les peptidoglycanes exprimés à la surface des bactéries, qui constituent des antigènes, cette enzyme permettrait l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte envers ces symbiontes (Heddi et al., 2005; Zaidman-Remy et al., 2006). Ce cas témoigne de la faculté de l'hôte à contourner son propre mécanisme de défense afin de maintenir la symbiose. Dans celui de *Brugia malayi*, un nématode qui héberge le symbionte *Wolbachia* wBm, dont le génome a été entièrement séquencé, c'est la perte par l'hôte d'une partie des gènes du système immunitaire, présents dans le génome d'espèces proches, qui permettrait aux symbiontes de survivre (Ghedini et al., 2007).

La bactérie doit également s'adapter aux conditions de vie induites par la symbiose. Le transfert vers l'hôte d'une grande partie des acides aminés produits (plus de 50%) représente par exemple une très forte contrainte pour les symbiontes d'insectes (Douglas et al., 2003). En effet, la trop faible proportion de certains acides aminés dans la bactérie entraîne leur substitution lors de la traduction, et un risque important de mauvaise conformation des protéines. La synthèse par *Buchnera aphidicola* d'une grande quantité d'HSPs (Heat Shock Protein), une famille de protéines chaperonnes impliquées dans la

réponse cellulaire à différents stress, protégerait le symbionte contre ce risque (Feder et Hofmann, 1999).

2.2 L'hôte face au symbionte

A l'inverse, la non-prolifération des symbiontes est également une condition essentielle au maintien de la symbiose. Dans les ectosymbioses du tube digestif, ce sont des prophages qui jouent en grande partie le rôle de régulateur de la communauté microbienne digestive (Gorski et Weber-Dabrowska, 2005). Pour de nombreuses endosymbioses, la digestion lyzozomale des symbiontes 'excédentaires' semble également un mécanisme de régulation essentiel. Dans le cas des endosymbioses, le contrôle par l'hôte de la division cellulaire des bactéries symbiotiques semble jouer un rôle régulateur important. *Wolbachia glossinidia* et *Blochmania floridanus*, deux symbiontes d'insectes hébergés directement dans le cytoplasme des bactériocytes, ont perdu le gène *dnaA*, dont le produit est essentiel à l'initiation de la réplication (Akman et al., 2002; Gil et al., 2003). Chez le symbionte du clam hydrothermal *Calymene okutanii* un gène essentiel à la cytodivision est absent (Kuwahara et al., 2007). Pourtant, des divisions bactériennes ont été observées en microscopie électronique. Par ailleurs une étude a montré que le charançon *Sitophilus* est capable de contrôler sa communauté endosymbiotique par la sécrétion d'un peptide antimicrobien : la coleopterine A (Login et al., 2011). Enfin, une étude récente a montré que le ver hydrothermal *Alvinella pompejana* produit un peptide antimicrobien, l'alvinellacine, capable de moduler et contrôler la communauté bactérienne ectosymbiotique présente au niveau des expansions tégumentaires dorsales (Tasiemski et al., 2014).

La sélection, le maintien et le contrôle des communautés symbiotiques au cours du temps, se fait donc en grande partie grâce au système immunitaire de l'hôte. Chez les invertébrés il existe seulement un système immunitaire inné qui, comme chez les vertébrés, fait intervenir des récepteurs et des acteurs intracellulaires qui interagissent les uns avec les autres *via* des cascades de transduction du signal produisant *in fine* une réponse défensive. Dans le cas de notre étude nous allons nous intéresser par la suite à l'immunité chez deux types d'invertébrés : les insectes et les crustacés.

2.3 L'immunité chez les insectes

Les insectes doivent faire face à de nombreux agents pathogènes. Beaucoup de ces agents pathogènes cherchent à envahir et coloniser les insectes. Lorsqu'ils entrent en contact avec eux, et dans de nombreux cas réussissent à les coloniser, ils conduisent à des effets nuisibles pour l'hôte. Une diversité d'organismes pathogènes peut infecter les insectes, incluant les virus, les bactéries, les champignons, les protozoaires, les nématodes, et même d'autres insectes (Mahy, 2004; Pennacchio et Strand, 2006; Vega et Kaya, 2012).

Pour réduire la probabilité d'infection, les insectes possèdent des barrières physiques qui empêchent les agents pathogènes de pénétrer dans leur corps (hémocèle). La première barrière physique qui empêche l'entrée des agents pathogènes est la cuticule (Siva-Jothy et al., 2005; Lundgren et Jurat-Fuentes, 2012). Cette cuticule composée de chitine, matériau hydrophobe, forme l'exosquelette de l'insecte, et recouvre aussi le tractus digestif à l'exception du tube digestif intermédiaire (midgut). Les agents pathogènes traversent la cuticule par les blessures de l'insecte ou par digestion enzymatique de la chitine. Les pathogènes peuvent aussi être ingérés par l'insecte. Ils sont alors immédiatement soumis à des barrières antagonistes, telles que les armatures cibarial ou pharyngial, les enzymes du système digestif, un pH inhospitalier, et le microbiote endogène (McGreevy et al., 1978; Siva-Jothy et al., 2005; Cirimotich et al., 2011; Lundgren et Jurat-Fuentes, 2012). Une fois que les pathogènes ont réussi à pénétrer dans le corps de l'insecte, ils vont résider dans l'intestin moyen, l'hémocèle, ou d'autres cellules et organes.

2.3.1 Anatomie de l'immunité des insectes

La reconnaissance de pathogènes étrangers et dangereux induit des réponses immunitaires réalisées par plusieurs types de cellules et de tissus du système immunitaire (Figure 7). Les hémocytes constituent les cellules immunitaires primaires des insectes (Strand, 2008; Hillyer et Strand, 2014). Ces cellules, présentes dans l'hémocèle, vont induire la phagocytose ou l'encapsulation des organismes pathogènes (Lackie, 1988; Strand & Pech, 1995; Gillespie et al., 1997; Irving et al., 2005) et produisent des facteurs immunitaires humoraux, conduisant à la mort du pathogène par lyse ou mélanisation (Christensen et al., 2005; Nappi et Christensen, 2005; Cerenius et al., 2008).

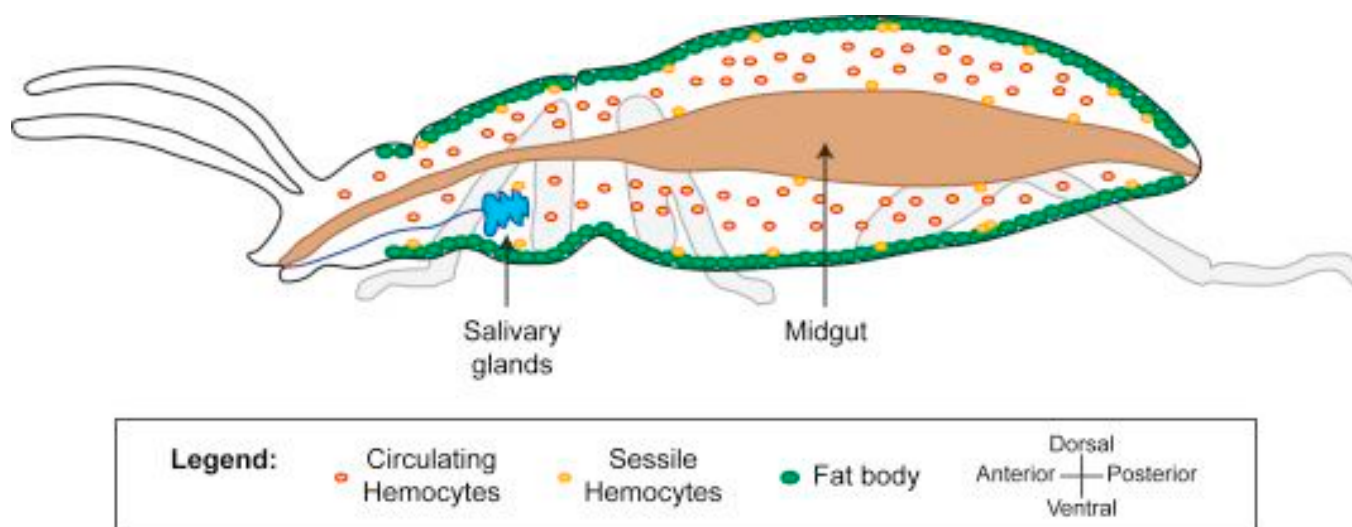


Figure 7 : Anatomie du système immunitaire des insectes (Hillyer 2016).

La cavité du corps de l'insecte, appelé hémocèle est un espace fluide et dynamique qui abrite les tissus ayant une activité immunitaire. Les cellules immunitaires primaires sont les hémocytes. Les hémocytes sont soit en circulation (hémocytes circulants) soit attachés aux tissus (hémocytes sessiles), où ils phagocytent, encapsulent et nodulent les pathogènes. Ils produisent aussi des facteurs immunitaires humoraux. Le corps gras, l'intestin moyen, les glandes salivaires, produisent de nombreux facteurs immunitaires humoraux (lyse et mélanisation).

Le corps gras, l'intestin moyen, et les glandes salivaires, sont également des facteurs importants de la réponse immunitaire des insectes. Le corps gras, qui est composé de cellules riches en lipides et glycogène, délimite le tégument de l'hémocèle (Larsen, 1976; Martins et al., 2011; Costa-Leonardo et al., 2013). Le corps gras produit et sécrète des peptides antimicrobiens ayant une activité lytique, ainsi que des composants supplémentaires de la réponse immunitaire humorale (Aggarwal et Silverman, 2008; Hillyer, 2010 ; Wang et al., de 2014a). L'intestin moyen est capable de produire des oxyde nitrique synthases et d'autres facteurs lytiques qui tuent les agents pathogènes présents dans le lumen de l'intestin ou qui tentent de traverser l'épithélium intestinal (Lehane et al., 1997; Luckhart et al., 1998; Lim et al., 2005; Buchon et al., 2009; Gupta et al., 2009). Les glandes salivaires, généralement situées dans la partie antérieure du thorax, produisent quant à elles, des facteurs influençant la viabilité de micro-organismes infectieux (Ferrandon et al., 1998; Pinto et al., 2008).

Ces tissus immunitaires, bien que physiquement et morphologiquement indépendants, interagissent au cours d'une infection. Par exemple, les facteurs produits par le corps gras, induisent l'activité immunitaire dans les hémocytes (Schmid et al., 2014). A l'inverse, les facteurs hémocytaires produits sont nécessaires pour l'activité immunitaire dans le corps gras (Brennan et al., 2007; Shia et al., 2009). Les facteurs immunitaires humoraux qui sont produits par les hémocytes sont également transportés dans l'intestin où ils exercent leur

activité de lyse et de mélanisation (Fraiture et al., 2009). Enfin, les facteurs produits par l'intestin moyen peuvent activer l'activité immunitaire du corps gras (Wu et al., 2012).

2.3.2 La signalisation immunitaire

La reconnaissance de l'agent pathogène induit l'activation des voies de transduction de signaux qui (1) amplifient la réponse immunitaire et (2) induisent la production de facteurs à activité antimicrobienne. Les trois voies de signalisation immunitaire les plus caractérisées chez les insectes sont la voie Toll, la voie IMD, et la voie Jak/Stat (Figure 8).

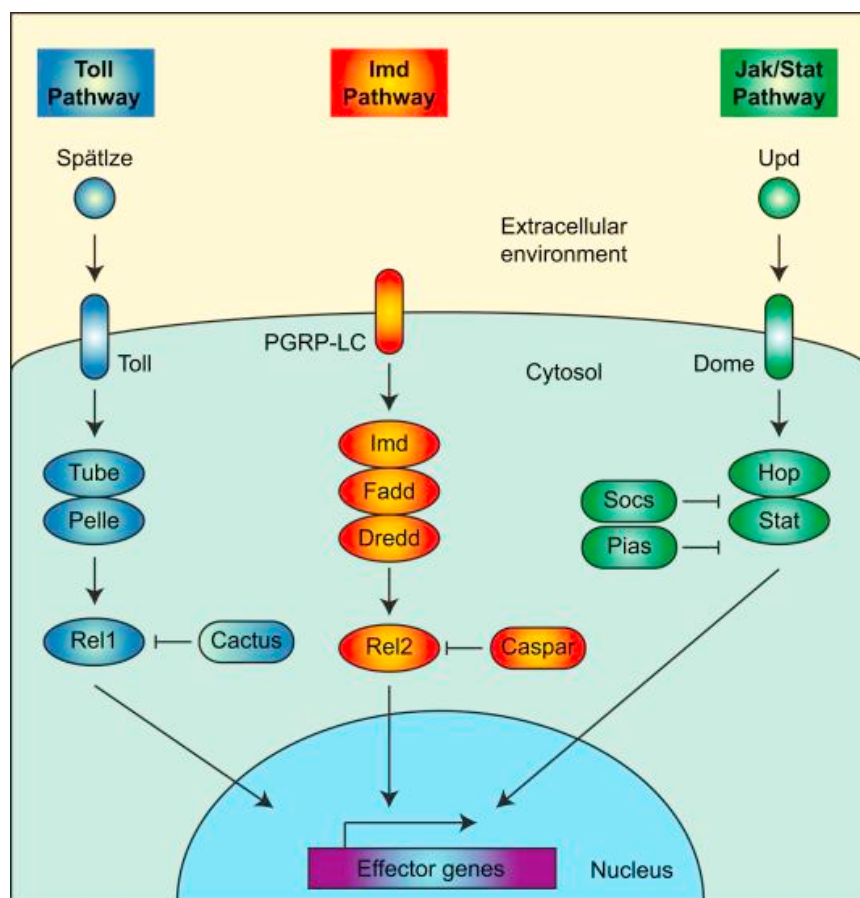


Figure 8 : Schéma simplifié illustrant les principaux acteurs des voies Toll, Imd et Jak/Stat, en utilisant les moustiques comme exemple (Hillyer 2016).

La voie Toll est une voie de signalisation conservée dans l'évolution, que les insectes utilisent à la fois dans le développement et l'immunité (Evans et al., 2006; Lemaitre et Hoffmann, 2007; Kingsolver et al., 2013; Clayton et al., 2014; Lindsay et Wasserman, 2014; Sim et al., 2014; Xu et Cherry, 2014; Cao et al., 2015). Dans le cas de l'immunité, la voie Toll est déclenchée lorsque des récepteurs ou « pattern recognition receptors » PRRs activent la

cytokine extracellulaire, Spätzle, qui se lie au récepteur cellulaire Toll, conduisant à l'activation d'une cascade de protéines : MyD88, Tube, Pelle, etc... La transduction du signal entraîne la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF- κ B (par exemple, Dif/Dorsal et Rel1), qui activent la transcription des peptides antimicrobiens et d'autres gènes d'effecteurs immunitaires. La voie Toll est principalement efficace dans la lutte contre les bactéries à Gram positif, les virus, les champignons, et dans le cas des moustiques, certains plasmodium (*Plasmodium berghei*).

D'une manière similaire, la voie Imd est activée lorsqu'un PAMP « microb-associated molecular pattern » se lie au récepteur extracellulaire PGPR-LC (protéines de reconnaissance du peptidoglycane) (Evans et al., 2006; Lemaitre et Hoffmann, 2007; Kingsolver et al., 2013; Clayton et al., 2014; Kleino et Silverman, 2014; Sim et al., 2014; Xu et Cherry, 2014; Cao et al., 2015). Ceci induit une signalisation intracellulaire par l'intermédiaire des protéines IMD, FADD, Dredd, qui conduit à la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF- κ B (par exemple, Relish et Rel2) et l'activation de la transcription des peptides antimicrobiens et d'autres gènes effecteurs de l'immunité. Cette voie immunitaire est principalement efficace dans la lutte contre les bactéries à Gram négatif, les virus, et dans le cas des moustiques, certains plasmodium (*Plasmodium falciparum*).

Comme la voie Toll, la voie Jak/Stat est impliquée dans le développement et l'immunité des insectes (Evans et al., 2006; Kingsolver et al., 2013; Clayton et al., 2014; Myllymaki et Ramet 2014; Sim et al., 2014; Xu et Cherry, 2014; Cao et al., 2015). Lors d'une infection, la voie Jak/Stat est activée lorsque la cytokine extracellulaire non appariée (Upd) se lie au récepteur cellulaire Domeless (Dome). Domeless est alors phosphorylée par la kinase Jak, qui recrute la protéine Stat. Puis la protéine Stat se dimérise et est transloquée dans le noyau, ce qui active la transcription des gènes antimicrobiens tel que l'oxyde nitrique synthase. La voie Jak/Stat est impliquée dans la réponse antibactérienne, antivirale, et dans le cas des moustiques, dans la réponse anti-Plasmodium.

Les voies Toll, IMD et Jak/Stat sont étroitement régulées. Leur activation est déclenchée par la liaison de PAMP par les PRR. Ces voies sont néanmoins gardées sous contrôle grâce à des inhibiteurs de facteurs de transcription, Cactus, Caspar et Socs / Pias, qui régulent négativement ou répriment respectivement la signalisation des voies Toll, IMD et Jak/Stat (Clayton et al., 2014; Kleino et Silverman, 2014; Lindsay et Wasserman, 2014; Myllymaki et Ramet, 2014).

Dans cette partie nous avons décrit brièvement le système immunitaire chez les insectes. Les mécanismes de l'immunité chez les crustacés sont similaires et reposent en grande partie sur les peptides antimicrobiens.

2.4 L'immunité chez les crustacés

Les crustacés ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif complexe et très spécifique basé sur les lymphocytes, les immunoglobulines et la mémoire immunitaire. Leur défense interne repose sur une réponse immunitaire innée moins spécifique mais très efficace et rapide contre les défenses des microorganismes. Le système immunitaire inné des crustacés est lié à leur hémolymphe et comprend une réponse cellulaire et humorale (Jiravanichpaisal et al., 2006). De manière comparable aux insectes, la défense innée de la crevette est déclenchée par des protéines/récepteurs capables de reconnaître les molécules associées aux pathogènes (PAMPs), (Vargas-Albores et al., 1997 ; Yepiz-Plascencia et al., 1998 ; Jimenez -Vega et al., 2002 ; Roux et al., 2002; Sritunyalucksana et al., 2002 ; Romo-Figueroa et al., 2004 ; Cheng et al., 2005 ; Du et al., 2007 ; Lin et al., 2008) et les lectines de type C (Luo et al., 2006 ; Liu et al., 2007 ; Sun et al., 2008). En général, la reconnaissance du non-soi active une cascade protéolytique de sérine-protéases qui amplifient le signal et déclenchent des réponses effectrices en aval. Ceci est rendu possible grâce aux voies de transduction du signal qui conduisent à l'élimination de l'envahisseur. En outre, la sérine protéase et ses inhibiteurs ont été trouvés dans les crevettes (Okumura, 2007), ainsi que les récepteurs Toll-like et d'autres voies de signalisations moléculaires (Arts et al., 2007 ; Yang et al., 2007 ; Yang et al., 2008). La défense humorale comprend également la production de métabolites d'oxygène et d'azote toxiques, des cascades enzymatiques complexes conduisant à la mélanisation, et des peptides antimicrobiens (PAMs) (Rosa et Barracco, 2010). Les PAMs sont l'un des composants majeurs du système immunitaire inné chez les crustacés.

2.4.1 Les peptides antimicrobiens : structures et modes d'actions

Le premier PAM a été décrit chez le lépidoptère *Hyalophora cecropia* (Boman et al., 1981). Ils sont retrouvés chez tous les organismes vivants, des microorganismes aux vertébrés. Ceux sont de petites molécules (<100 acides aminés) cationiques, amphiphiles (Zasloff et al. 2002) qui diffèrent considérablement dans leurs séquences en acides aminés et

leur conformation structurale. Ils sont généralement retrouvés dans l'hémolymphe ou le sang et sur les surfaces épithéliales les plus exposées aux microorganismes. Le mode d'action des PAMs est déterminé par sa conformation structurelle, sa charge cationique et son caractère amphiphile. De manière générale les PAMs agissent en déstabilisant l'intégrité de la membrane de la cellule cible (Figure 9) (Brogden et al., 2005 ; Yount et al., 2006 ; Nguyen et al., 2011). La portion cationique du PAM s'attache à la membrane de la cellule cible chargée négativement, et après une première interaction électrostatique, le peptide s'insère dans la membrane et la perméabilise grâce à sa portion hydrophobique. Le microorganisme est alors détruit *via* la déstabilisation de la membrane et/ou la formation de pores ((Brogden et al., 2005 ; Yount et al., 2006). Les PAMs peuvent être aussi transférés dans le cytoplasme du microorganisme pour agir sur des cibles intracellulaires spécifiques comme des protéines, des acides nucléiques ou la synthèse de la paroi cellulaire (Kamysz et al., 2003 ; Brogden et al., 2005 ; Yount et al., 2006 ; Hale et Hancock 2007 ; Nicolas, 2009). Chaque PAM a son propre spectre d'activité et peut avoir des fonctions multiples agissant aussi bien sur la membrane cellulaire que sur les sites internes (Yount et al., 2006).

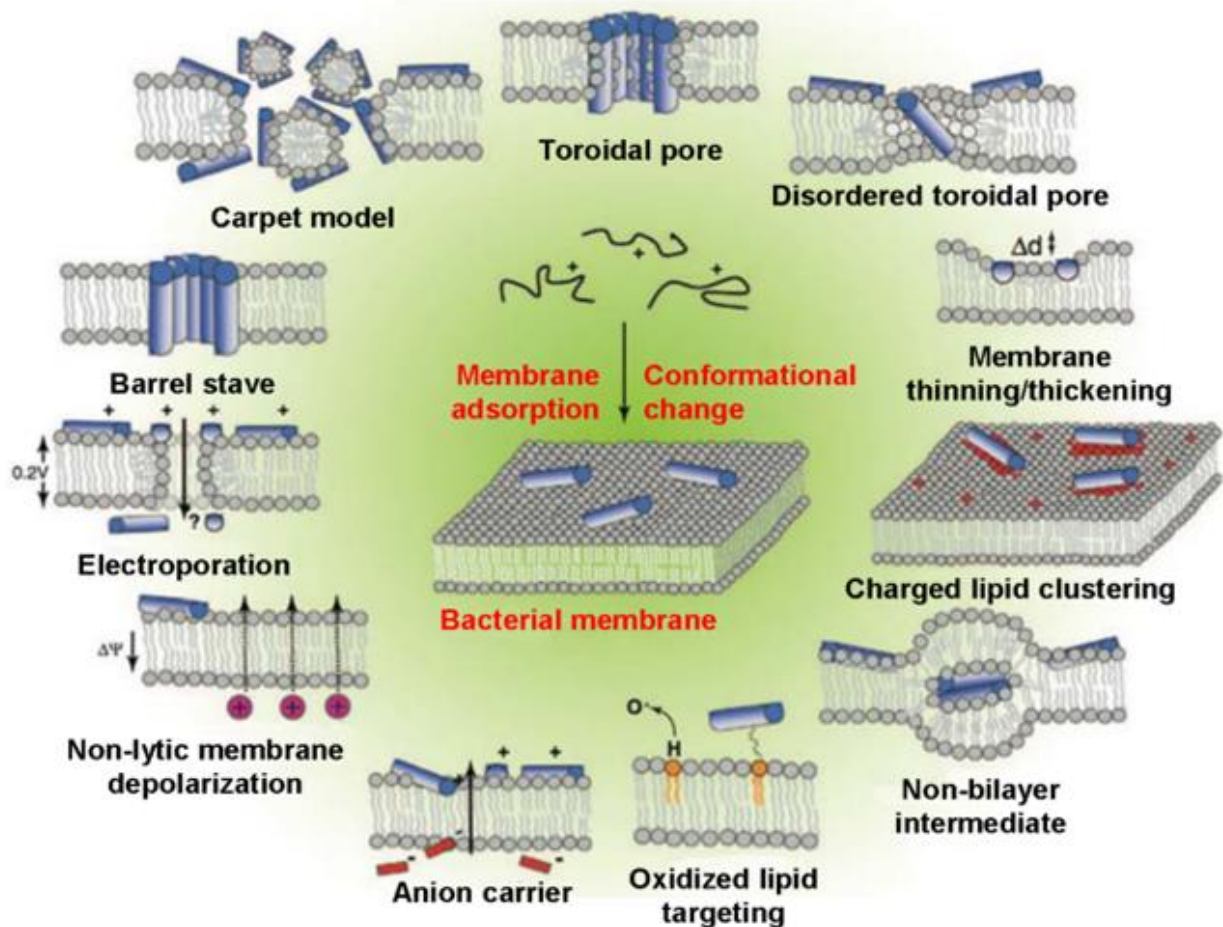


Figure 9. Mécanismes clés de la rupture de la membrane cytoplasmique bactérienne par un peptide antimicrobien (PAM) (modifiée de Nguyen et al., 2011).

Ces événements peuvent avoir lieu simultanément. Dans les modèles classiques de la rupture de la membrane, les peptides se trouvant sur la membrane atteignent une concentration de seuil et s'insèrent à travers la membrane pour former soit des pores dans le modèle « barrel stave », ou pour solubiliser la membrane en structures micellaires dans le modèle de tapis (carpet model), ou forme des pores de peptide-et-lipidlined dans le modèle de pore toroïdal. Dans le modèle révisé de pores toroïdal désordonnée, la formation des pores est plus aléatoire et implique moins de peptides. L'épaisseur de la double couche peut être affectée par la présence des peptides, ou la membrane elle-même peut être remodelée pour former des domaines riches en lipides anioniques entourant les peptides. Dans des cas plus particuliers, les intermédiaires non bicouches dans la membrane peut être induite; l'adsorption du peptide sur la membrane peut être améliorée en ciblant les phospholipides oxydés; le peptide peut s'associer avec de petits anions à travers la bicouche, ce qui entraîne leur efflux; le potentiel membranaire peut être dissipée sans autre dommage notable; ou au contraire, dans le modèle moléculaire d'électroporation, l'accumulation du peptide sur le feuillet externe augmente le potentiel de membrane au-dessus d'un seuil qui rend la membrane perméable transitoirement à diverses molécules, y compris les peptides eux-mêmes.

Actuellement 15 familles de PAM sont recensées chez les crustacés (Tableau 2) (Rosa et Barracco, 2010). Notre modèle d'étude portant sur la crevette *Rimicaris exoculata*, je me focaliserai essentiellement dans cette partie, sur les caractéristiques et le rôle des différents peptides antimicrobiens impliqués dans le système immunitaire de la crevette.

Tableau 2 : Classification des peptides antimicrobiens (PAM) chez les crustacés selon leur composition en acides aminés et leur structure (modifié de Rosa et Barracco, 2010)

Groupes	PAM	Ordre
PAM à domaine unique avec une chaîne α linéaire et riche en certains acides aminés	Bac-like	Decapoda (crabe)
	Callinectin	Decapoda (crabe)
	Astacidin 2	Decapoda (écrevisse)
	Armadilidin	Isopoda (cloporte)
	Homarin	Decapoda (homard)
Peptides à domaine unique contenant des résidus cystéines formant des ponts disulfures	Defensin	Decapoda (homard)
	Anti-LPS factor	Decapoda
	Scygonadin	Decapoda (crabe)
PAM à domaines multiples	Penaeidin	Decapoda (crevette pénaïde)
	Crustin	Decapoda Amphipoda
	Hyastatin	Decapoda (crabe)
	Arasin	Decapoda (crabe)
	Stylicin	Decapoda (crevette pénaïde)
PAM non conventionnels	Histones et fragment dérivés	Decapoda (crevette pénaïde)
	Hemocyanin et peptides dérivés	Decapoda (crevette, écrevisse)

2.4.2 Les facteurs antimicrobiens chez la crevette

Pour des raisons économiques, les peptides les mieux caractérisés sont ceux des espèces cultivées et plus particulièrement les crevettes marines pénéïdes (Zhao et Wang 2008). Les peptides jouent un rôle important dans l'immunité innée des crevettes. Des études ont mis l'accent activement sur l'identification et la caractérisation des peptides dans les crevettes pénéïdes. En fait, huit types de PAMs ont été trouvés dans les crevettes pénéïdes. Ce sont les pénaeidines (Destoumieux et al., 1997, 1999, 2000, 2016 ; Cuthbertson et al., 2004 ; Muñoz et al., 2004 ; Kang et al., 2004, 2007), les crustines (Gross et al., 2001 ; Amparyup et al., 2008a ; Jia et al., 2008 ; Jiang et al., 2015), les facteurs anti-lipopolysaccharide (Alfs) (Gross et al., 2001 ; Liu et al., 2005 ; Liu 2006, Somboonwiwat et al., 2005, 2008 ; Tharntada et al., 2008), les histones (Patat et al., 2004), les hémocyanines (Destoumieux-Garzón et al., 2001 ; Zhang et al., 2004), les lysozymes (Hikima et al., 2003 ; Sotelo-Mundo et al., 2003 ; Bu et al., 2008 ; de la Re Vega et al., 2006 ; Burge et al., 2007 ; Xing et al., 2009), une lectine de type C (Sun et al., 2008), et les peritrophins (Loongyai et al., 2007).

a) Les facteurs anti-lipopolysaccharides (ALFs)

Les ALFs, peptides de base, ont d'abord été trouvés en tant qu'anticoagulant puissant chez les limules, *Limulus polyphemus* et *Tachypleus tridentatus*, qui inhibent l'activation par une endotoxine la cascade de coagulation (Tanaka et al., 1982). Par la suite, plusieurs études ont démontré que les ALFs d'hémocytes de la limule *L. polyphemus* ont des caractéristiques similaires à celles des lipopolysaccharides en terme de liaison et de neutralisation. Cependant les processus de coagulation chez les crustacés sont distincts de ceux de la limule et sont plus proches de ceux des insectes où les ALFs ne semblent pas prendre part à ce processus (Theopold et al., 2004). Chez les crustacés, les ALFs de crabe ont d'abord été identifiés à partir des hémocytes de crevettes pénéides *Litopenaeus setiferus* (Gross et al., 2001) et *Penaeus monodon* (Supungul et al., 2002). À ce jour, les gènes codant pour ALFs ont été seulement identifiés chez les crustacés décapodes, comme les crevettes pénéides, les crevettes d'eau douce (Rosa et al., 2008 ; Lu et al., 2009 ; Tassanakajon et al., 2010), les écrevisses (Liu et al., 2006), le homard (Beale et al., 2008) et les crabes (Yedery et Reddy, 2009a ; Yue et al., 2010). Les séquences ALF de crustacés décapodes sont codées comme des molécules précurseurs. Ces précurseurs sont composés d'une séquence leader suivie d'un grand peptide mature (environ 11 kDa) contenant une région N-terminale très hydrophobe, et de deux résidus cystéine caractéristiques. La structure de l'ALF de crevette est constituée de trois hélices alpha (une à l'extrémité N-terminale et deux à l'extrémité C-terminale) emballées contre un feuillet β à quatre brins, comme chez la limule (Yang et al., 2009). Les ALFs présentent un large spectre d'activités antimicrobiennes très efficaces (MIC $<6,25 \mu\text{M}$) contre un grand nombre de bactéries à Gram positives et à Gram-négatives, ainsi que sur plusieurs pathogènes opportunistes de *Vibrio*, des champignons et des virus humains (Morita et al., 1985; Aketagawa et al., 1986; Muta et al., 1987, Somboonwiwat et al., 2005; Carriel-Gomes et al., 2007; Yedery et Reddy, 2009a).

b) Les Penaeidines

Les pénaeidines représentent la famille des PAMs la mieux décrite chez les crustacés (Bachère et al., 2000, 2004; Destoumieux et al., 2000a; Cuthbertson et al., 2008; Tassanakajon et al., 2010). Ce sont des peptides cationiques chimériques composés d'un domaine N-terminal non structuré riche en PRP et une région C terminale contenant 6 résidus de cystéines formant 3 ponts disulfures (Destoumieux et al., 1997; Yang et al., 2003;

Cuthbertson et al., 2005) (Figure 10A). Les pénaeidines ont été isolées pour la première fois à partir de l'hémolymphe d'une crevette blanche du Pacifique *Litopenaeus vannamei* (Destoumieux et al., 1997). Ce sont des PAMs ubiquitaires des crevettes de la famille des Penaeidae. Il existe 4 sous-groupes de pénaeidines (PEN2, PEN3, PEN4 et PEN5) possédant chacun une signature en acides aminés caractéristique et des fonctionnalités biochimiques communes (Cuthbertson et al., 2002; Gueguen et al., 2006; Kang et al., 2007). Chez des crevettes naïves (non infectées), les précurseurs des pénaeidines sont exprimés de manière constitutive et adressés aux granules cytoplasmiques (Desmoutieux et al., 2000b). La production de pénaeidines est limitée au granules contenant des hémocytes qui peuvent être libérés dans l'hémolymphe ou infiltrés dans les tissus de la crevette (Bachère et al., 2004). Ces PAMs sont particulièrement efficaces contre les bactéries à Gram positive (MIC de 0,3-2,5µM *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*) et les champignons filamenteux (MIC of about 1,25-2,5 µM: *Fusarium*, *Nectria*, *Alternaria*, *Neurospora*, *Botrytis*, *Penicillium*), mais très peu actifs contre les bactéries à Gram négatif et les vibrios marins (Cuthbertson et al., 2008). Enfin les pénaeidines sont capables de se lier à la chitine de l'hôte, ce qui leur permettrait de participer à la cicatrisation et/ou au processus de mue (Desmoutieux et al., 2000b).

c) Les Crustines

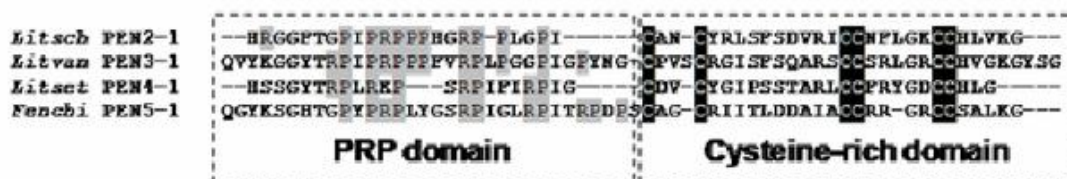
Les crustines sont généralement définies comme des polypeptides antibactériens à multi-domaines cationiques possédant un domaine protéique acide ou motif "whey acidic protein" (WAP) dans la région C-terminale. (Smith et al., 2008). La première crustine a été identifiée chez les hémocytes granulaires du crabe *Carcinus maenas* qui montrait des activités spécifiques contre les bactéries marines à Gram positifs et tolérantes au sel (Relf et al., 1999). Depuis la première caractérisation de cette crustine, plus de 50 crustines et séquences similaires ont été identifiées chez les crustacés (écrevisses, crevettes, crevettes d'eau douce, crabes et homards) ainsi que chez les crustacés non décapodes (le branchiopode *Artemia Franciscana* et le copépode *Calanus finmarchius*) (Smith et al., 2008). En terme de structure, toutes les crustines connues possèdent une séquence leader en N-terminal et un domaine WAP dans la région C-terminal. Le domaine WAP semble avoir une activité inhibitrice des protéases et une activité antimicrobienne (Ranganathan et al., 1999, Cerenius et Söderhäll, 2004). Les crustines sont catégorisées en 4 groupes (Type I, II, III et IV) selon leur structures (Figure 10B) (Tassanakajon et al., 2015). Les crustines de Type I possèdent une région riche

en cystéines de longueur variable entre la séquence leader et le domaine WAP. Les crustines de Type II sont caractérisées par la présence d'une région hydrophobe contenant une surreprésentation des résidus de glycine en amont des domaines riches en cystéine et WAP trouvés dans crustines de Type I. Les crustines de Type III possèdent une courte région riche en prolines entre la séquence leader et le domaine WAP, mais ne contiennent pas le domaine riche en cystéines caractéristique présent dans les deux crustines de Types I et II, ni la région riche en glycines. Ces peptides sont généralement connus sous le nom de domaine unique lactosérum ou « single whey domain » (SWD) protéiques, protéines chelonianin-like ou protéines antileucoprotéase-like. Les crustines de type IV présentent deux domaines WAP mais ne possèdent pas de séquences spécifiques dans la région N-terminale. Les tests antimicrobiens ont montré que les crustines sont majoritairement actives contre les bactéries à Gram positif (MIC<8µM) incluant les genres *Micrococcus*, *Aerococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* et *Bacillus* (Relf et al., 1999; Zhang et al., 2007; Supungul et al., 2008; Imjongjirak et al., 2009; Sperstad et al., 2009a). A l'inverse, une crustine de *Penaeus monodon* (crustin-like Pm) de Type II a montré une forte activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (CMI<5µM), notamment contre le pathogène opportuniste *Vibrio harveyi* (Amparyup et al., 2008b).

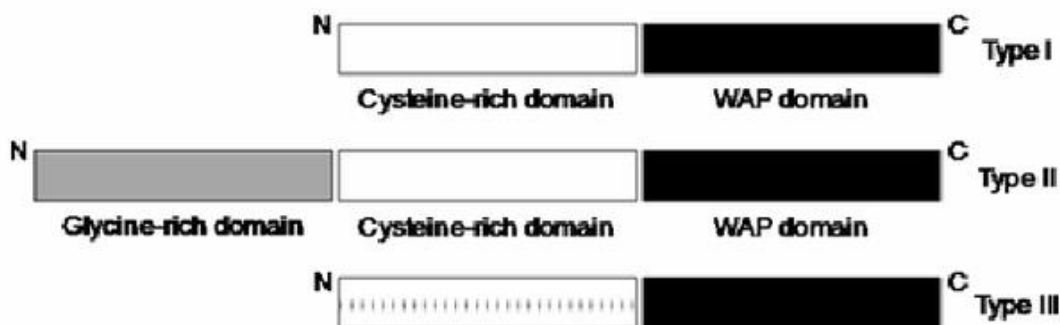
d) Les Stylicines

Les stylicines sont des peptides anioniques avec un point isoélectrique théorique de 5. Ils sont composés de 82 acides aminés et sont caractérisés par une région riche en proline dans la région N-terminale et contiennent 13 résidus cystéines dans la région C-terminale (Figure 10C) (Rolland et al., 2010). Elles ont été décrites pour la première fois chez la crevette *Litopenaeus stylirostris* (de Lorgeril et al., 2005). La Ls-Stylicin1 n'a pas montré une activité significative contre les bactéries, mais présente une forte activité antifongique sur *Fusarium oxysporum*.

(A) Pénaédines



(B) Crustines



(C) Stylicine

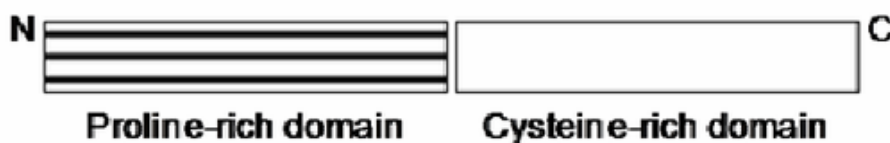


Figure 10 : Peptides antimicrobiens à domaines multiples chez les crustacés (modifiée de Rosa and Barracco, 2010).

(A) Comparaison des séquences des différents sous-groupes de pénaédines (PEN2 à PEN5). (B) Illustration schématique (non à l'échelle) des trois types de crustines (Type I à III). (C) Représentation schématique (non-à-échelle) de la stylicine de la crevette *Litopenaeus stylirostris*. Dans les alignements d'acides aminés, les résidus proline/arginine et les cystéines conservées sont mis en évidence respectivement dans les boîtes grises et noires.

2.4.3 Rôle des facteurs antimicrobiens chez la crevette

Les crevettes ont efficacement développé et utilisé leur système immunitaire inné dans la lutte contre les micro-organismes pathogènes. À ce jour, neuf types de facteurs antimicrobiens ont été identifiés dans les crevettes, à savoir, les ALFs, les pénaédines, les crustines, les styalcines, les lysozymes, les hémocyanines anioniques, les histones, et une lectine de type C. Ces types de PAMs ont des profils et des fonctions de distribution et d'expression différentes chez les crevettes (Tableau 3 et la Figure 11) (Zhao et Wang 2008). Même si un grand nombre de PAMs a été trouvé chez les crevettes, il y a encore un nombre limité d'études menées sur les propriétés antibactériennes de ces facteurs antimicrobiens et leurs autres fonctions. On ne sait actuellement rien sur la co-localisation des différentes

familles d'AMP dans les cellules immunitaires chez les crustacés. Il est généralement admis que les PAMs sont rapidement libérés dans l'hémolymphe à partir des granules lors de la stimulation cellulaire par les pathogènes envahisseurs (Jiravanichpaisal et al., 2006), comme cela se produit chez la limule (Iwanaga et Lee, 2005). En conséquence, les PAMs combattent et contrôlent les infections extracellulairement lors de la réponse systémique. Cependant, ces molécules pourraient aussi exercer leur activité au niveau intracellulaire au sein des phagosomes. D'autre part, un nombre important de ces PAMs sont composés de différents domaines (pénaidines, crustines, stylicines). Cette caractéristique structurelle contraste avec les PAMs couramment décrits chez d'autres organismes, même chez les groupes phylogénétiquement apparentés, tels que la limule (Iwanaga et Lee 2005) et les insectes (Bulet et Stöcklin, 2005), qui possèdent essentiellement de petits peptides à domaine unique. L'implication de ces différents domaines dans différentes fonctions immunitaires ou physiologiques chez les crustacés est incertaine. Le rôle biologique de ces protéines pourrait être essentiellement dû à leur conformation structurelle globale (en formant des structures amphiphiles cationiques) et non dû à leurs domaines indépendants intramoléculaires. Toutefois, le rôle multifonctionnel de certains PAMS est mieux décrit. Par exemple, l'activité de liaison à la chitine de la pénaidine participe vraisemblablement à la cicatrisation des plaies et au processus de mues (Destoumieux et al., 2000a, Sperstad et al., 2009b). Les propriétés de fixation des ALFs et de la stylicines au LPS et l'activité d'inhibition de la protéase de la crustine de Type III bloquent les protéases des pathogènes et/ou régulent les cascades de protéases endogènes.

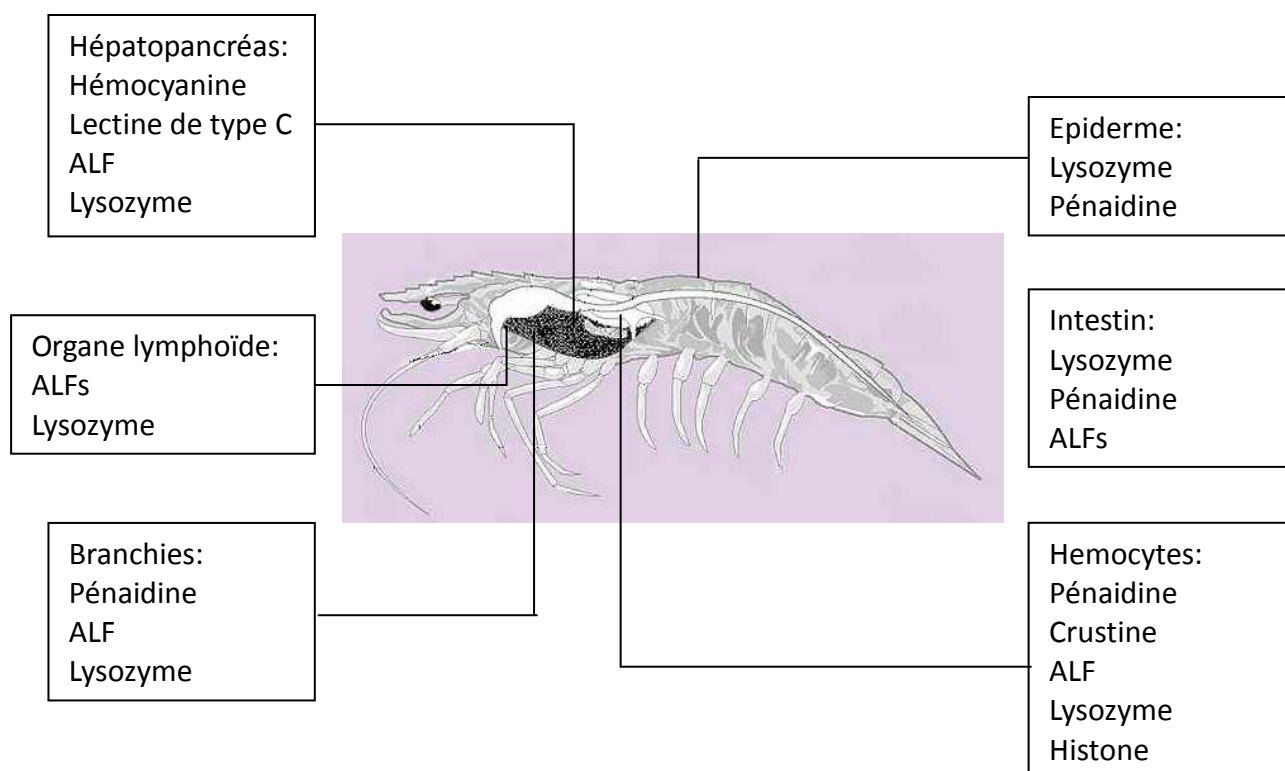


Figure 11 : Répartition des facteurs antimicrobiens chez la crevette (modifié de Zhao and Wang 2008)

PAMs		Bactéries		Champignons	
		Gram positif	Gram négatif	Filamenteux	Levures
ALFs		***	***	***	NA
Pénaidines	PEN2	***	NA	***	NA
	PEN3	***	NA	***	***
	PEN4	***	NA	***	***
	PEN5	***	**	***	NT
Crustines	Type I	***	NA	NA	*
	Type II	***	*	*	NT
	Type III	***	***	**	**
Stylicines		NA	*	***	NA
Lysozyme de type C		**	**	NT	NT
Histones		**	NA	NT	NT

Tableau 3 : Propriétés antimicrobienne des facteurs antimicrobiens chez la crevette (modifiée de Rosa and Barracco, 2010). Minimal inhibitory concentration (MIC) values: *** up to 10 μ M; ** 10-20 μ M; * 20-40 μ M ; NA: not active (>40 μ M) ; NT: not tested.

III. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds

Dans cette partie nous allons décrire notre modèle d'étude, la crevette *Rimicaris exoculata*. Afin de bien comprendre le mode de vie de cet organisme, nous allons, dans un premier temps, décrire son milieu de vie, les sources hydrothermales, leur formation, leur distribution et leurs caractéristiques physico-chimiques. Dans un second temps, nous nous intéresserons brièvement à la faune symbiotique ayant colonisé les abords des sources hydrothermales de par le monde, et enfin nous décrirons l'écosystème et la biologie de *Rimicaris exoculata*.

1. Qu'est-ce qu'un écosystème hydrothermale océanique profond ?

80% des fonds océaniques se trouvent à plus de 3 000 m de profondeur, là où règne un univers enténébré et froid. Faute de photosynthèse, la vie végétale est absente. Pourtant la vie est malgré tout possible dans les abysses. Mais la plupart du temps, il s'agit d'une vie limitée entretenue par les débris tombés de la surface : bois coulés, cadavres de cétacés, éléments minéraux, neige marine, etc., nourrissant de rares créatures aux aspects insolites (Wolff, 1970; Blankenship-Williams et Levin, 2009). L'existence des sites hydrothermaux est connue depuis la plongée du sous-marin Alvin en 1977 au large des Galápagos, ce lieu est visiblement propice à la vie (Lonsdale, 1977). Les sites hydrothermaux sont principalement localisés au niveau des dorsales océaniques 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 et al., 2005). Ces zones sont le siège de phénomènes hydrothermaux.

1.1. Localisation des gisements hydrothermaux profonds

Les sites hydrothermaux profonds (de 700 à plus de 4 000 m sous la surface de l'océan) sont localisés dans des zones à forte activité tectonique (Figure 12) : soit à proximité des zones d'accrétion, le long des dorsales médio-océaniques (peuvent être citées la ride médio-atlantique [MAR] ou la ride Est-Pacifique [EPR]) ; soit à proximité des zones de subduction, au niveau des bassins arrière-arc (tels que le bassin Nord Fidjien ou le bassin de Lau) ; soit enfin en contexte de volcanisme de point chaud (tel que le mont sous-marin Loihi près d'Hawaï) (Van Dover, 2000).

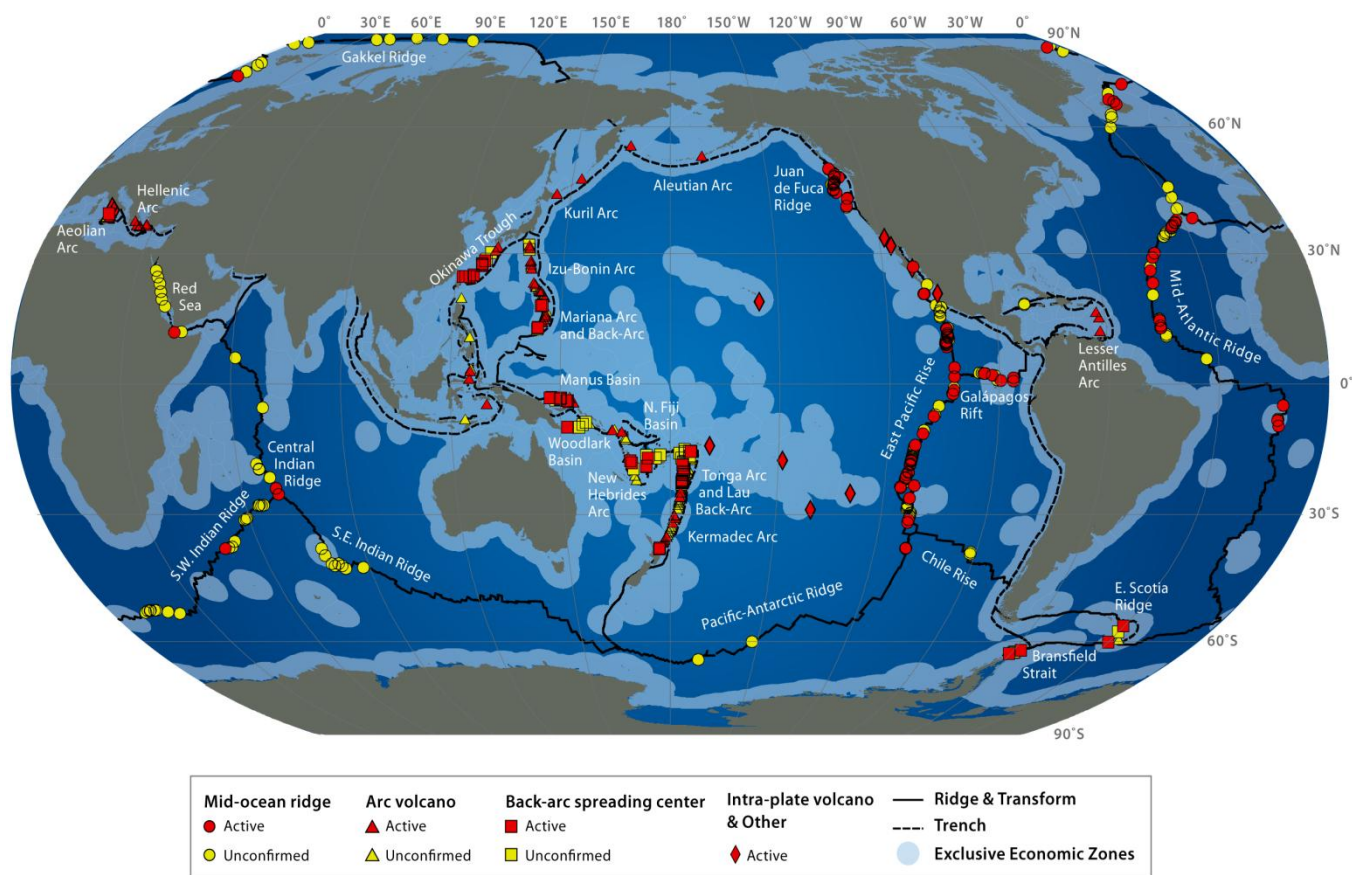


Figure 12 : Carte mondiale des systèmes hydrothermaux recensés. (<http://vents-data.interridge.org>)

1.2. Naissance des édifices hydrothermaux profonds

Lors des mouvements tectoniques de divergence et donc d'expansion océanique, du magma en fusion est émis au niveau des dorsales, formant *de novo* la croûte océanique volcanique. De par les contraintes géodynamiques qui existent au niveau des dorsales océaniques, et d'autre par la nature et le type de roches volcaniques formé, la croûte océanique va se rétracter, se fissurer, créant ainsi des réseaux de failles et fractures dans lesquelles, l'eau de mer froide, dense et oxygénée va pouvoir s'infiltrer jusqu'à plusieurs kilomètres de profondeur (2 à 3 km) (Edmond et al., 1982). A cette profondeur, la température (1 200°C) ainsi que la pression, sont plus importantes qu'au niveau du plancher océanique, augmentant le pouvoir de solubilisation de l'eau (Kelley et al. 2002) lors des interactions eau/roches. Pendant son parcours dans la lithosphère, et sous l'effet conjoint de la température et de la pression, la composition de l'eau de mer va changer, elle va petit à petit se transformer en fluide hydrothermal. En effet, lors de son passage, l'eau de mer va lessiver et interagir avec les roches crustales : basaltes, gabbros et gaz dissous qu'elle rencontre.

Ainsi, l'eau de mer va s'acidifier, perdre certains de ces éléments (Mg^{2+} , SO_4^{2-} , NO_3^{2-} ou PO_4^{2-}) et se charger en gaz dissous (H_2S , CH_4 , CO , CO_2 , H_2 , etc.) et en ions métalliques (Si, Fe, Mn, Zn, etc.) et parfois en composés réduits d'origine abiotique (Von Damm, 2000; Charlou et al., 2002; Charlou et al., 2010; Fouquet et al., 2010). Ce fluide devient alors anoxique, acide, de salinité variable et sa composition contraste très fortement avec celle de l'eau de mer. La composition du fluide dépend de la nature des roches sous-jacentes et varie d'un site à l'autre, mais aussi dans l'espace et dans le temps au sein d'un même site (Jannasch et Mottl, 1985; Johnson et al., 1986; Humphris et al., 1995; Charlou et al., 2010; Fouquet et al., 2010). Sous l'effet de la forte pression, ce fluide va remonter jusqu'à la surface du plancher océanique. Pouvant atteindre plus de 20 m de hauteur, les cheminées des "fumeurs noirs" s'édifient lorsque les minéraux dissous et entraînés par ces flux d'eaux souterraines précipitent en remontant au contact de l'eau de mer froide et oxygénée (2-3°C environ) (Figure 13).

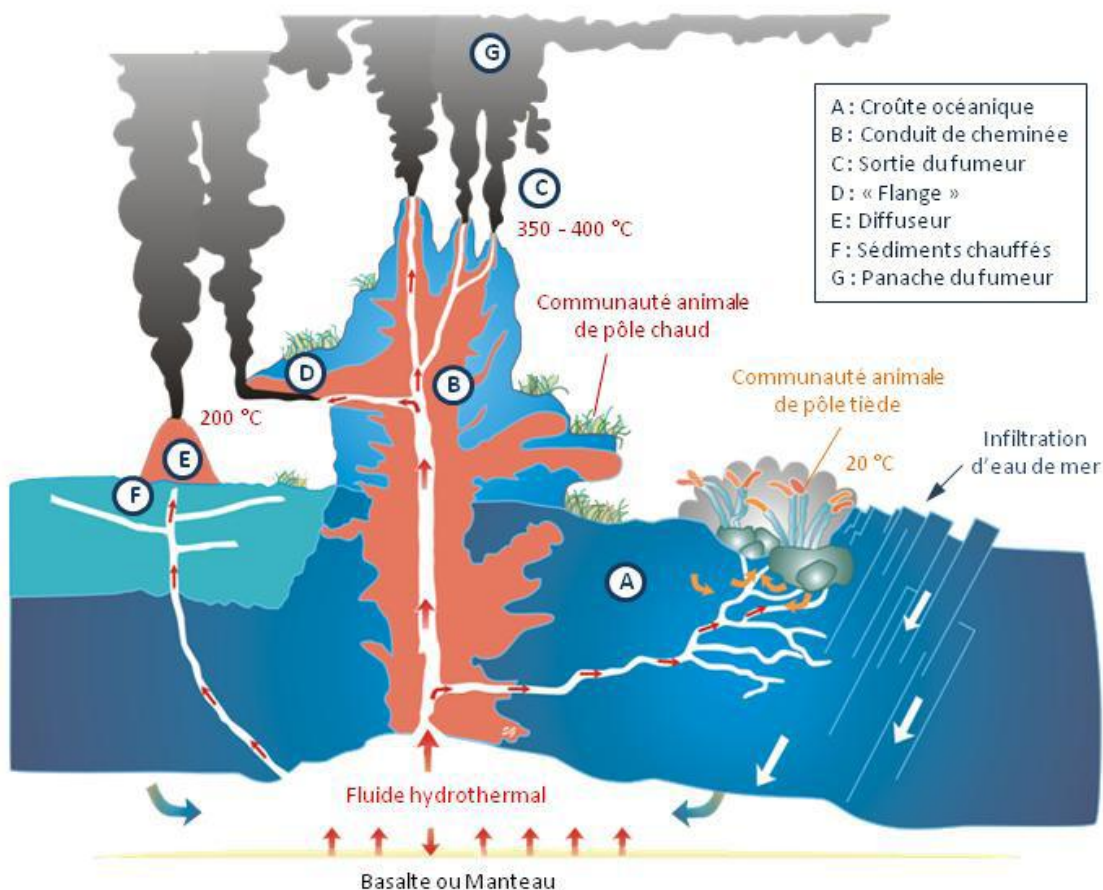


Figure 13 : Représentation schématique du fonctionnement d'une source hydrothermale profonde.
(Modifié d'après Jannasch and Taylor, 1985)

La cheminée hydrothermale d'où sort le fluide est nommée fumeur ; on en distingue trois types : les fumeurs noirs, les fumeurs blancs et les diffuseurs. Dans le cas des fumeurs noirs (Figure 14), le fluide est émis à de très fortes températures (jusqu'à 400°C) et avec un

débit important (0,7-2,4 m.s-1) (Elderfield et Schultz, 1996). Les cheminées formées sont constituées de sulfures (comme l'anhydrite ou la pyrite) où viennent s'ajouter des sulfures de cuivre, de fer et de zinc (Fouquet et al., 2010). L'accumulation de ces derniers permet de stabiliser les structures et d'y créer un gradient horizontal de température. La durée d'existence d'un site hydrothermal dépend de la vitesse d'accrétion de la dorsale où il est situé, allant de quelques dizaines d'années pour des dorsales rapides (telle que la ride Est Pacifique) à quelques dizaines de milliers d'années pour certains sites de dorsales lentes (telle que la ride Médio-atlantique) (Rona et al., 1993, Lalou et al., 1995, Fouquet et al., 2010).

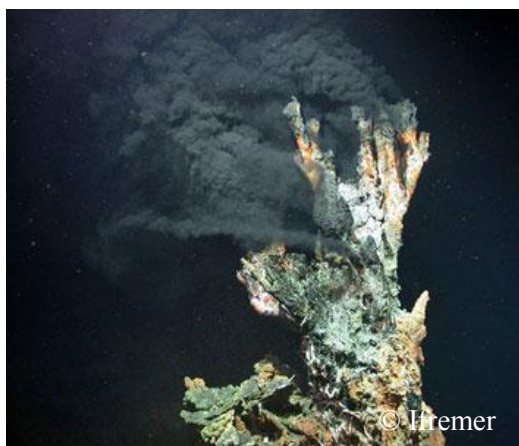


Figure 14 : Fumeur noir du site Logachev (MAR).



Figure 15 : Fumeurs blancs d'une zone volcanique (Sud-Ouest Pacifique).

Les fumeurs blancs se distinguent des fumeurs noirs par leur coloration blanche, ou incolore, des fluides sortants (Figure 15). Cette différence de coloration est relative à la composition des fluides émis. Les fluides des fumeurs blancs sont dilués en partie dans l'eau de mer, sont à plus basse température (entre 150°C et 250°C), et sont notamment composés de Zn, Au, Ag, Sb, Cd, Pb et de sulfate de calcium (Tivey et al., 1995). Les fluides entièrement incolores correspondent à des fluides avec une différence de salinité importante avec l'eau de mer mais ne contenant pas, ou peu, de particules minérales.

En ce qui concerne les diffuseurs, le fluide sortant est de température moindre (< 150°C). Ils sont qualifiés de diffuseur compte tenu de la faible vitesse d'émission (0,1-0,5 m.s-1) et de l'absence de conduit principal ; le fluide diffusant à travers la paroi par un réseau de petits canaux. Ces structures sont plus fragiles et s'étendent davantage horizontalement que dans le cas des fumeurs noirs.

Outre les fumeurs, une autre possibilité est la percolation de fluides hydrothermaux à travers des sédiments riches en matière organique et en sulfates, comme c'est le cas dans le

bassin de Guaymas. Ces sédiments sont notamment le siège d'une importante activité sulfato-réductrice (Jørgensen et al., 1990, 1992; Elsgaard et al., 1994).

1.3. Les sites hydrothermaux de l'Atlantique

D'une longueur de 60 000 km, la dorsale médio-atlantique (ou MAR pour 'Mid Atlantic Ridge') demeure peu explorée. Seules quelques centaines de kilomètres ont été explorées et une quinzaine de sites hydrothermaux ont été découverts. L'exploration de cette dorsale a débuté en 1985 et concerna une zone délimitée au Nord par le plateau des Açores (38°N) et au Sud par le site Logatchev (14°45'N). Les différents sites hydrothermaux découverts depuis lors présentent des conditions environnementales très différentes les uns des autres, différences liées à la nature des roches et aux variations de profondeur (Figure 16). Les sites les plus profonds (au-delà de 3 000 m de profondeur) sont relativement stables ; le site Trans Atlantic Geotraverse (TAG) abriterait une activité hydrothermale depuis 100 000 ans, avec un site actif actuel estimé à 40 000 ans (Rona et al., 1993, Lalou et al., 1995). Beaucoup de sites hydrothermaux de la MAR reposent sur des roches basaltiques comme c'est le cas des sites TAG (26°08'N) et Snake Pit (23°23'N). Certains reposent en revanche sur des roches ultramafiques du manteau terrestre comme le site Rainbow (36°14'N), Logatchev (14°45'N) ou Ashadze (13°N) (Fouquet et al., 2010). Les fluides hydrothermaux de ces sites mantelliques sont enrichis en gaz dissous tel que le méthane ou le dihydrogène mais appauvri en sulfure d'hydrogène (Charlou et al., 2002). Au contraire des fluides des sites mantelliques, ceux des sites basaltiques sont enrichis en sulfure d'hydrogène mais relativement appauvris en méthane et en éléments minéraux tel que le cuivre ou le fer (Chiba et al., 2001).

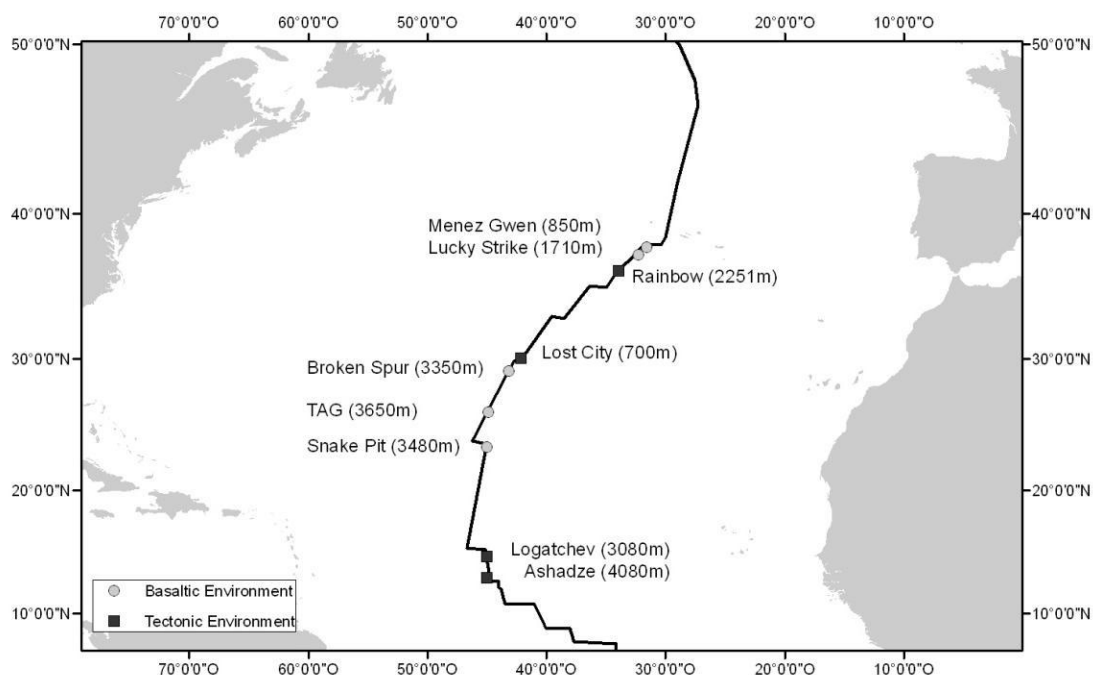


Figure 16 : Carte des principaux sites hydrothermaux recensés sur la MAR (Fabri et al., 2011.).

a) Le site Rainbow

Le site Rainbow (36°14'N), découvert en 1997 lors de la campagne Flores (Fouquet et al., 1997), est situé sur le segment nord de la MAR. C'est la zone la plus profonde des zones actives du point triple des Açores (2320m), (Fouquet et al., 1997). Le champ hydrothermal couvre une surface de 250 m sur 60 m, à l'intersection de la ride et d'une faille non-transformante (Fouquet et al., 1997). Des roches ultrabasiques y affleurent et seule une veine de basalte située à un kilomètre à l'est du champ hydrothermal a pu être localisée (Fouquet, 1997). Ce contexte ultrabasique et les processus de séparation de phase conduisent à un enrichissement des dépôts en cuivre et en zinc ainsi qu'à des fluides chauds (360° C) de forte chlorinité (> 750 mmol/kg), de faible pH (< 3), très enrichis en gaz (par exemple, CH₄ jusqu'à 2,2 mmol/kg (Donval et al., 1997) relativement pauvres en H₂S (< 2.5mmol/kg) (Charlou, 1997). Ces fluides présentent les plus fortes concentrations en Fe²⁺ mesurées sur les sites hydrothermaux de la MAR (24 mmol.l⁻¹) (Charlou et al., 2002) qui en s'oxydant donne une couleur rouge-orangée aux cheminées (Figure 17).

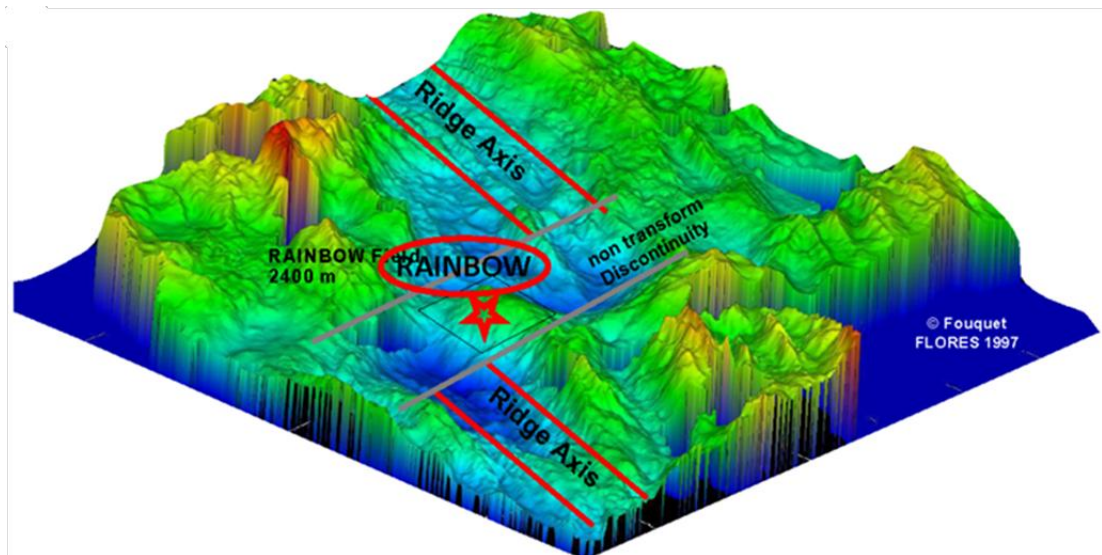


Figure 17 : Carte bathymétrique du site Rainbow sur la MAR
Campagne FLORES, 1997 (Charlou et al. 2002)

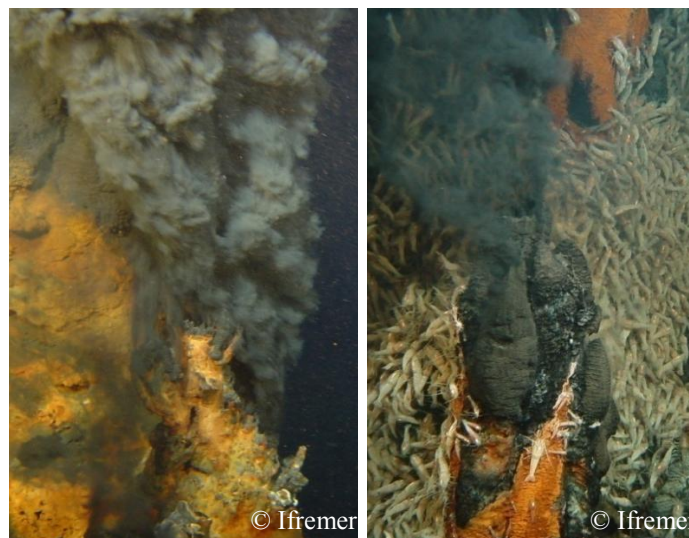


Figure 18 : Photographies prises sur le site hydrothermal Rainbow.
A gauche, les parois d'une cheminée colonisée par des crevettes *Rimicaris exoculata*. Au centre, des émissions de fluides sur une cheminée active. A droite, une émission de fluide hydrothermal noir devant un agrégat de *Rimicaris exoculata*

b) Le site de Logatchev

Le site Logatchev (14°45'N) est situé non loin de la zone de "Vema fracture" (11°N), à l'intérieur d'un petit plateau où la profondeur varie entre 2 900 et 3 060 m (Figure 19). Sa découverte fait suite à plusieurs expéditions russes entre 1991 et 1995 (Sudarikov et Roumiantsev, 2000). La structure du champ hydrothermal ainsi que les données géochimiques ont été décrites par Sudarikov et Roumiantsev (2000) (Figure 20).

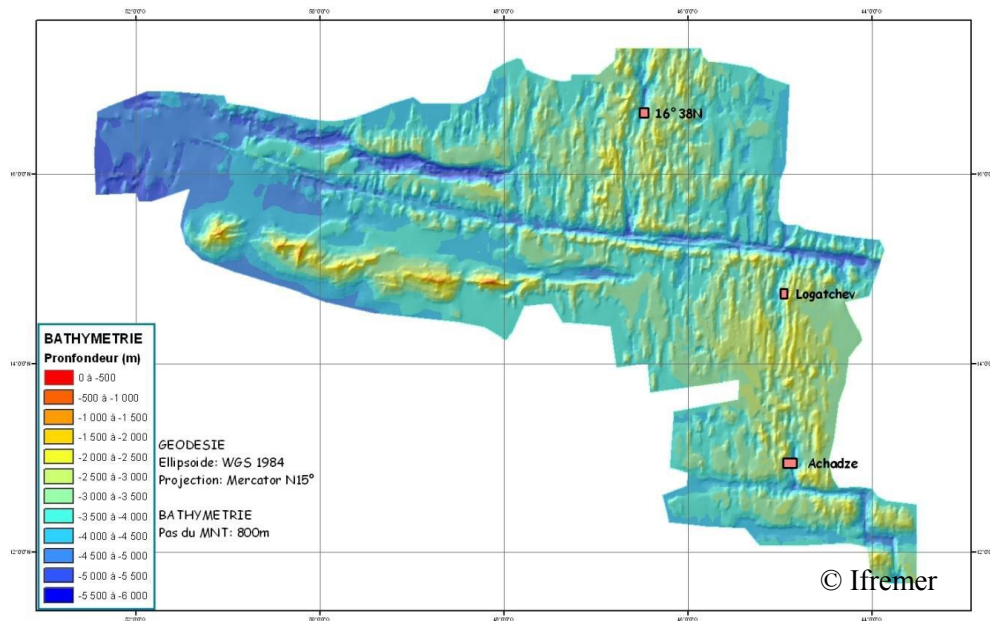


Figure 19 : Carte bathymétrique de la campagne SERPENTINE (2007) sur la MAR. Les carrés rouges correspondent aux sites hydrothermaux, avec au centre, le site Logatchev et au sud, le site Ashadze. Source : H. Ondréas



Figure 20 : Photographie prise sur le site Logatchev lors de la campagne SERPENTINE. A gauche, une structure colonisée par des crevettes *R. exoculata*. A droite, sont également présents des *Bathymodiolus*.

c) Le site d'Ashadze

Le site hydrothermal d'Ashadze fut découvert en 2007. Ce champ hydrothermal se compose en réalité de trois sites hydrothermaux rapprochés, localisés à 13°N, 44°50'W (Fouquet et al., 2008). Avant sa découverte, de précédentes études avaient détecté des anomalies de turbidité et de manganèse dissous dans la colonne d'eau, signes de la présence potentielle d'émissions de fluides hydrothermaux (Sudarikov et Roumiantsev, 2000). La colonisation du site Ashadze 1 surprend de par la rareté des organismes eucaryotes symbiotiques. Deux espèces forment en revanche de denses populations (des anémones et des

polychètes). Sur les parois des cheminées, deux espèces de crevettes se côtoient : *Mirocaris fortunata* et *Rimicaris exoculata* dans une moindre proportion. En effet, seules quelques rares crevettes *R. exoculata* sont présentes, contrairement à ce que l'on peut observer sur d'autres sites de la MAR (Fouquet et al., 2008; Fabri et al., 2011) (Figure 21).



Figure 21: Photographies prises sur le site Ashadze lors de la campagne SERPENTINE (2007). A gauche un fumeur actif. A droite, on peut observer la présence d'anémones *Maractis rimicarivora*.

d) Le site de TAG (Trans Atlantic Geotraverse)

Le site de TAG (26°08'N) est situé à une profondeur de 3 620 m environ, à 2,4 km de la ride (Thompson et al., 1998) sur une croûte basaltique très ancienne (100 000 ans environ) (Humphris et al., 1995 ; Rona et al., 1993). Sur le mont TAG les fluides ont été mesurés jusqu'à 366°C (Edmond et al., 1995) dans des fumeurs noirs au pH acide. A des zones d'activité de basse température correspondant à l'émission de fluide dilué, sont associés des dépôts d'oxyde de manganèse (Rona et al., 1986) (Figure 22). La faune hydrothermale est dominée par la crevette *Rimicaris exoculata*, mais la présence de vers polychètes et d'anémones a aussi été reportée (Rona et al., 1986).

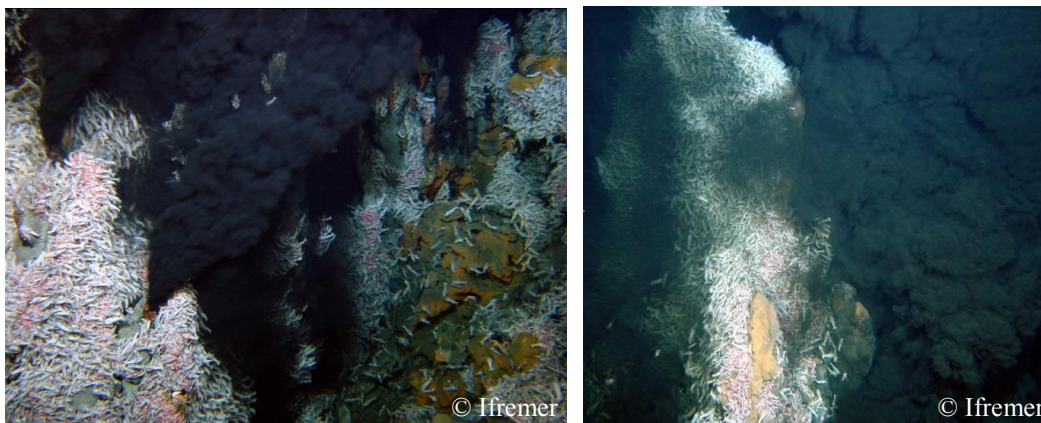


Figure 22 : Photographies prises sur le site hydrothermal TAG (Campagne BICOSE 2014). Les parois des cheminées sont colonisées par des crevettes *Rimicaris exoculata*. D'importantes émissions de fluides de couleur noire s'échappent de multiples conduits.

e) Le site de Snake Pit

Le site de Snake Pit (23°23'N) est un site actif jeune daté à moins de 4000 ans, situé à une profondeur d'environ 3 480 m (Karson et Brown, 1988). Ce site est assez remarquable de par sa diversité minéralogique et géochimique (Fe, Zn, Cu Cd, Pb, Sb, Sn, Mn...) (Fouquet et al., 1993, 2010; Charlou et al., 2010). Deux types de cheminées peuvent être observés : les cheminées à conduit ouvert et les diffuseurs qui sont les plus nombreux (Figure 23). Les cheminées du site Snake Pit sont enrichies en pyrrhotite, isocubanite (Fouquet et al., 1993) traduisant des conditions beaucoup plus réductrices que celle de TAG où ces minéraux sont absents. Les fluides sont chauds (335-350°C) et acides (pH= 3,7-3,9). Les concentrations en CO₂, H₂S, et H₂ sont équivalents à ceux mesurés sur TAG (Charlou et al., 2010) mais inférieure d'un ordre de grandeur en CH₄. Les faibles concentrations en hydrogène indiquent une interaction hydrothermale profonde essentiellement localisée dans les basaltes.

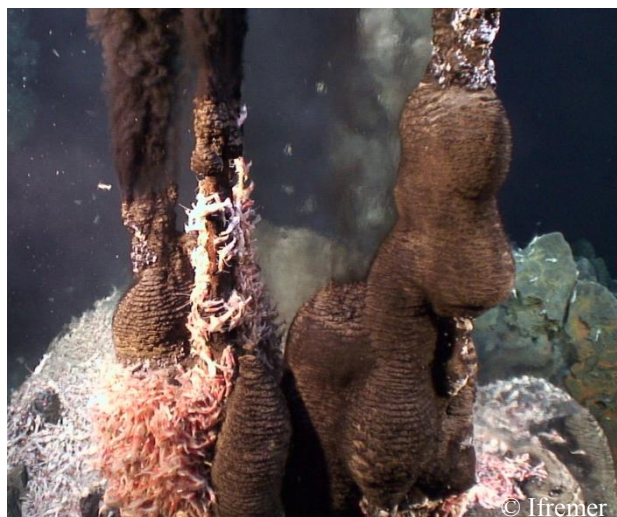


Figure 23 : Photographies prises sur le site hydrothermal Snake Pit (Campagne BICOSE 2014)
Les parois des cheminées sont colonisées par des crevettes *Rimicaris exoculata*.

Chacun de ces sites présente des caractéristiques différentes concernant leurs compositions en fluide, résumées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Concentrations de certains minéraux et gaz mesurées dans les fluides hydrothermaux purs des sites de la MAR Rainbow, Logatchev, Ashadze, TAG et Snake Pit (Charlou et al., 2010).

	Eau de mer	Rainbow	Logatchev	Ashadze	TAG
Profondeur (m)		2320	3000	4080	3620
Température (°C)	2 - 3	365	350	355	320/290
pH	7.8	2.8	3.3	3.1	3.1
H₂S (mM)	0	1.2	0.5/0.8	1	6.7
CH₄ (mM)	0.0003	2.5	2.1	0.5/1.2	0.124/0.147
H₂ (mM)	0.0004	16	12.0	8/19	0.15/0.37
CO₂ (mM)	2.30	16	10.1	3.7	2.9/3.4
N₂ (mM)	0.59	1.8	3.0	2/5.5	0.90
Fe (μM)	<0.001	24050	2500	9300	1640
Si(OH)₄ (mM)	<0.2	6.9	8.2	6.6	22.0
Cl (mM)	546	750	515	614	659
Br (μM)	838	1178	818	1020	880/1045
Ca (mM)	10.2	66.6	27.3	42.8	26.0
Mn (μM)	<0.001	2250	330	1062	1000
Cu (μM)	0.007	121/162	15/50	138	150
Zn (μM)	0.01	115/185	25/30	108	46

2. Les microorganismes des sources hydrothermales océaniques

En absence totale de lumière et sans apport important de carbone issu de la photosynthèse se déroulant en surface, le réseau trophique de l'écosystème hydrothermal profond repose sur la chimiosynthèse microbienne. Le terme chimiosynthèse a été créé par analogie au terme photosynthèse pour désigner la fixation du dioxyde de carbone (CO₂) à

l'obscurité (Jannasch et Wirsén, 1979). Dans le cadre de cette introduction nous nous focaliserons sur la description des microorganismes bactériens, sachant que les *Archaea* constituent une part importante des microorganismes des sources hydrothermales, à la fois autotrophes et hétérotrophes, présents à différentes températures, sur tous les sites explorés, et ayant un rôle essentiel de producteur primaire dans la chaîne alimentaire (Prieur et al., 1995; Nercessian et al., 2003; Roussel et al., 2009; Brazelton et al., 2010).

2.1. Les métabolismes bactériens en présence dans ces écosystèmes

Dans le cas des écosystèmes hydrothermaux profonds, on peut parler plus précisément de chimiolithoautotrophie. Les organismes chimiotrophes obtiennent leur énergie (catabolisme) en oxydant des composés organiques ou inorganiques, composés réduits tels que les sulfures. On distingue parmi les chimiotrophes, les organismes organotrophes, dont le catabolisme est basé sur l'oxydation des composés organiques et les lithotrophes, qui tirent leur énergie de l'oxydation de composés inorganiques réduits : fer (Fe^{2+}), ammonium (NH_4^+), hydrogène sulfuré (H_2S), etc. La plupart de ces bactéries obtiennent leur carbone de composés inorganiques (CO_2 , CO , CH_4) et sont appelées autotrophes. Les bactéries autotrophes s'opposent aux hétérotrophes qui dépendent de source de carbone organique (Madigan et Martinko, 2007) (Figure 24).

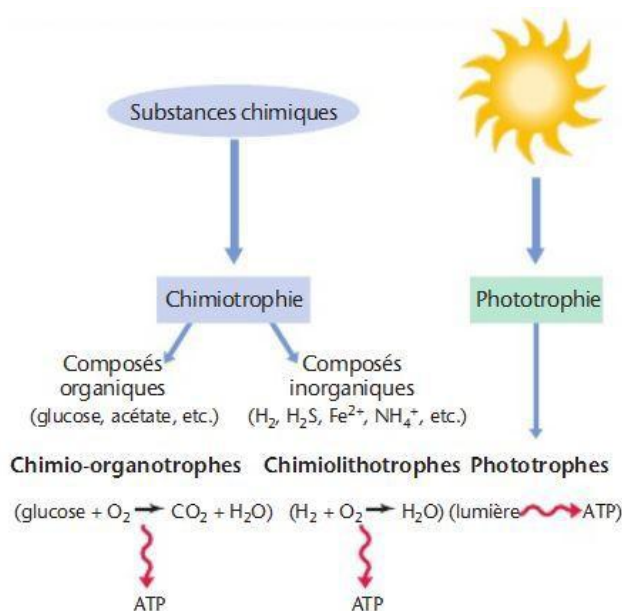


Figure 24 : Différentes options métaboliques pour l'obtention d'énergie. Les substances chimiques indiquées dans la figure ne constituent qu'une petite partie des composés utilisés par les organismes chimiotrophes (Madigan et Martenko, 2007).

Les fluides hydrothermaux constituent une formidable ressource en composés réduits et en composés inorganiques permettant à cette communauté bactérienne de proliférer et de constituer ainsi le premier maillon de la chaîne alimentaire : les producteurs primaires. D'après les connaissances actuelles sur les métabolismes microbiens et sur l'environnement hydrothermal, il est possible de répertorier les principales voies métaboliques présentes chez les microorganismes des sources hydrothermales (Tableau 5).

Tableau 5 : Exemples des principaux métabolismes bactériens connus dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques. n.s. signifie que le métabolisme est utilisé par une grande diversité de microorganismes.

Type respiratoire	Donneurs d'électrons	Accepteurs d'électrons	Source de carbone	Processus métabolique	Groupes représentatifs
Anaérobie	H ₂	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrification	n.s.
	H ₂	S ⁰	CO ₂	Sulfo-réduction	<i>Deltaproteobacteria</i>
	H ₂	SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	CO ₂	Sulfato – Thiosulfatoréduction	<i>Deltaproteobacteria</i>
	CH ₄	SO ₄ ²⁻	CO ₂	Oxydation anaérobie du méthane	n.s.
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , Fe ³⁺	CO ₂	Oxydation anaérobie de l'ammoniac	<i>Planctomycetes</i>
	S ₂ ⁻ , S ₀ , S ₂ O ₃ ²⁻	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrification, Sulfooxydation	n.s.
	[CH ₂ O] _n	NO ₃ ⁻	[CH ₂ O] _n	Dénitrification	n.s.
	[CH ₂ O] _n	Fe ³⁺ , Mn ²⁺	[CH ₂ O] _n	Ferro-réduction	<i>Deferribacter</i> , <i>Geovibrio</i>
	[CH ₂ O] _n	S ⁰ , SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	[CH ₂ O] _n	Hétérotrophie, réduction de composés soufrés	n.s.
	[CH ₂ O] _n	[CH ₂ O] _n	[CH ₂ O] _n	Fermentation	<i>Proteobacteria</i> , <i>Thermotoga</i>
Aérobie	H ₂	O ₂	CO ₂	Oxydation de l'hydrogène	<i>Proteobacteria</i> , <i>Aquifex</i>
	HS ⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	O ₂	CO ₂	Sulfo-oxydation	<i>Proteobacteria</i>
	Fe ²⁺	O ₂	CO ₂	Ferro-oxydation	<i>Proteobacteria</i>
	Mn ²⁺	O ₂	CO ₂	Oxydation du manganèse	<i>Proteobacteria</i>
	NH ₃ , NO ₂ ⁻	O ₂	CO ₂	Nitrification	<i>Proteobacteria</i> , <i>Nitrospira</i>
	CH ₄ , CO et autres composés en C1	O ₂	CO ₂ , composés en C1	Méthanotrophie, méthylotrophie	<i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>
	[CH ₂ O] _n	O ₂	[CH ₂ O] _n	Hétérotrophie aérobie	n.s.

2.2. Les types d'habitats microbiens et les microorganismes associés

Même si l'écosystème hydrothermal est caractérisé par une importante variabilité spatiale et temporelle, celui-ci présente plusieurs types d'habitats hébergeant des communautés microbiennes (Campbell et al., 2006) (Figure 25).

Les microorganismes sous forme libre peuvent être retrouvés soit dans le fluide hydrothermal dilué, sur les particules émises par les cheminées ou dans les roches poreuses

des édifices hydrothermaux actifs (Roussel et al., 2009, 2011). Ils se développeraient soit dans la biosphère souterraine sous-jacente aux cheminées et seraient transportés par le fluide (Deming et Baross, 1993; Huber et al., 2002, 2003; Roussel et al., 2011; Dick et al., 2013), soit dans les panaches hydrothermaux, correspondant à de l'eau de mer enrichie par les minéraux des fluides hydrothermaux. Ces panaches hydrothermaux peuvent atteindre des tailles considérables (jusqu'à 20 km de diamètre) (Fitzsimmons et al., 2014; Povck al., 2015). Les microorganismes formant des biofilms, appelés également tapis microbiens, sont présents à la surface des fumeurs, des organismes animaux ou des sédiments (Brazelton, 2010; Crépeau et al., 2011). Les microorganismes peuvent aussi se développer dans les sédiments des champs hydrothermaux où le fluide percole (e.g. Bassin de Guaymas) (Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2003; Biddle et al., 2012 ; Vigneron et al., 2013, 2014 ; Cruaud 2014). Enfin les microorganismes peuvent s'associer à des métazoaires hydrothermaux en endosymbiose, en ectosymbiose ou en episymbiose. Citons par exemple les communautés microbiennes associées aux vestimentifères (e.g. *Riftia pachyptila*), aux mollusques (e.g. *Bathymodiolus azoricus*), aux polychètes (e.g. *Alvinella pompejana*), ou aux crustacés (e.g. *Rimicaris exoculata*).

Cependant cette typologie reste théorique car les microorganismes ne sont pas obligatoirement inféodés à un seul type d'habitat. Néanmoins elle permet d'orienter les stratégies d'échantillonnage et de décrire la structure spatiale des peuplements microbiens.

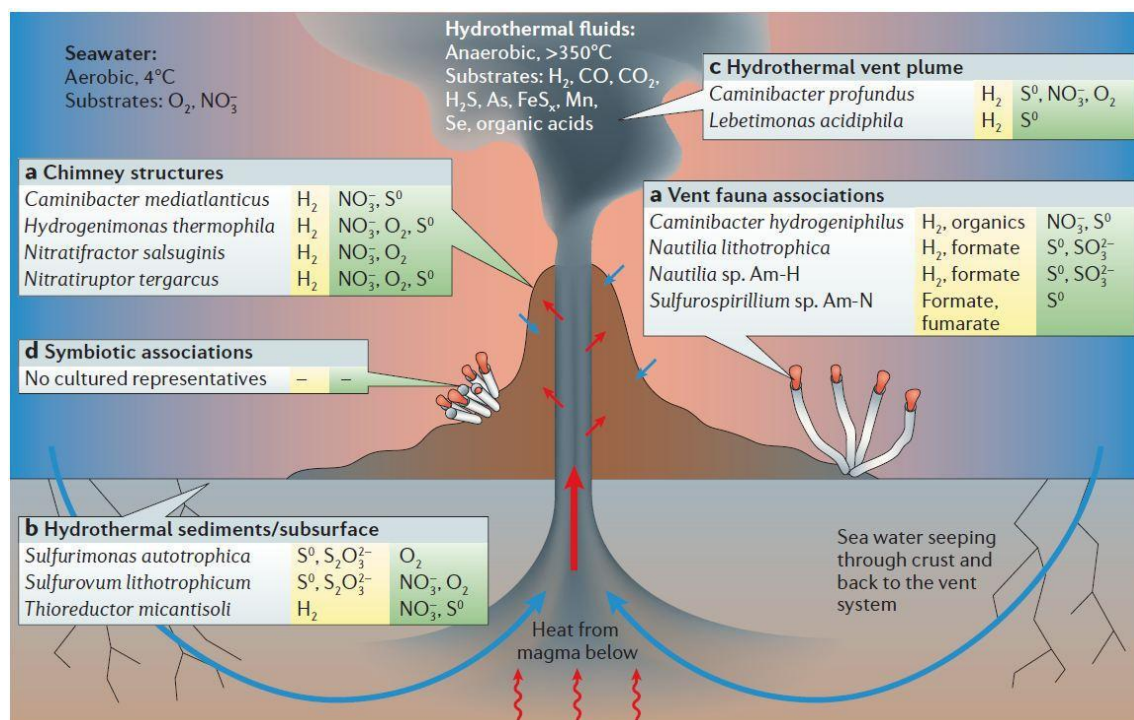


Figure 25 : Représentation des différents types de métabolismes bactériens associés à l'hydrothermalisme (ici chez les *Epsilonproteobacteria* cultivées) (Campbell et al., 2006).

2.3. Les microorganismes chimiosynthétiques : des partenaires idéals

Les communautés microbiennes chimioautotrophes jouent un rôle important dans l'élaboration et le développement de la vie autour des édifices hydrothermaux. Ces microorganismes sont retrouvés soit sous forme libre, soit en interaction avec les animaux hydrothermaux (Tableau 3).

Tableau 6 : Caractéristiques de diverses symbioses impliquant des bactéries chimiotrophes. Métabolisme : sulfo-oxydant (SOX), méthanotrophe (MOX), ferro-oxydant (FOX), oxydation de l'hydrogène (HOX) ; Localisation : intracellulaire (I), extracellulaire (E) ; Transmission : horizontale (H) ; modifié d'après Duperron, 2005.

Hôte				Symbiontes			
Taxon		Espèce	Habitat	Phylotypes principaux	Métabolismes	Localisation	Transmission
Annelida	Alvinellidae	Alvinella pompejana	Hydrothermal, Pacific Est	Epsilonproteobacteria	SOX	E (cuticule)	?
	Siboglinidae	Riftia pachyptila	Hydrothermal, Pacific Est	Gammaproteobacteria	SOX, HOX	I (trophosome)	H
Mollusca: Bivalvia	Mytilidae	Bathymodiolus puteoserpentis	Hydrothermal, fluides froids	Gammaproteobacteria	SOX, MOX, HOX	I (branchies)	H
Mollusca: Gasteropoda	Provannidae	Alviniconcha hessleri	Hydrothermal, Pacific	Epsilonproteobacteria	SOX, MOX?	I (branchies)	H
Arthropoda	Alvinocarididae	Rimicaris exoculata	Hydrothermal, Atlantique	Epsilon-, Gammaproteobacteria	SOX, MOX, FOX, HOX	E (chambre branchiale)	H?
				Epsilon-, Gamma-, Zetaproteobacteria, Deferribacters, Mollicutes		E (tube digestif)	?

Les symbioses chimiosynthétiques se font entre un partenaire autotrophe (le(s) symbionte(s) procaryote(s)) et un hôte hétérotrophe (l'hôte eucaryote). L'hôte permet au symbionte d'accéder aux substances minérales ainsi qu'à l'oxygène et peut fournir, dans les cas où le symbionte se situe dans les cellules ou dans une cavité (ex. : tube digestif) de l'hôte, une protection efficace contre les prédateurs et les variations de l'environnement. L'oxydation des substances minérales fournit de l'énergie, utilisée pour la fixation du carbone et la synthèse de matière organique. Selon la substance minérale oxydée par le symbionte, le métabolisme mis en jeu pourra être différent (Tableau 5). Ces oxydations permettent l'élaboration par le symbionte de molécules carbonées, qui sont transférées à l'hôte qui les consomme dans son métabolisme. La diversité de ces symbioses en terme de partenaires impliqués, de modalités des associations, d'adaptations anatomiques, physiologiques et/ou comportementales des partenaires est extrêmement complexe (Dubilier et al., 2008).

Parmi les eucaryotes impliqués dans une symbiose bactérienne, on peut s'intéresser en particulier : au vestimentifère *Riftia pachyptila*, aux mollusques bivalves *Bathymodiolus*, à l'annélide polychète *Alvinella pompejana* et au crustacé Alvinocaridé *Rimicaris exoculata*.

3. Les associations symbiotiques dans les écosystèmes hydrothermaux

De nombreux chercheurs ont été surpris de découvrir qu'autour de ces fumeurs noirs, le fluide hydrothermal, acide, anoxique, riche en métaux lourds, en particules radioactives et sulfure d'hydrogène, et très chaud (jusqu'à 400°C), s'avère, une fois dilué, composé de microorganismes qui nourrissent une chaîne alimentaire suffisamment diversifiée pour qu'on y retrouve toutes les grandes familles d'animaux marins (hormis les vertébrés à poumons). Au milieu des vastes plaines abyssales, les sources hydrothermales apparaissent donc comme de véritables oasis, en arborant les densités animales les plus élevées du milieu marin, avec des biomasses pouvant dépasser 50kg/m² (Carney, 1994). La faune hydrothermale est dominée par des communautés de mollusques, d'arthropodes et de polychètes (Wolff, 2005). Leurs capacités à réguler rapidement leur métabolisme face aux conditions fluctuantes du milieu, couplées à des pièces anatomiques protectrices (coquilles, tubes, carapaces) permettent cette prédominance dans le milieu. Plus de 500 espèces endémiques au milieu hydrothermal étaient recensées en 2005 (Desbruyères et al., 2000; Wolff, 2005).

Cette concentration étonnante d'animaux autour des cheminées hydrothermales repose essentiellement sur l'existence de communautés procaryotes chimiolithoautotrophes, capables de fixer le carbone inorganique présent dans l'eau de mer grâce à l'énergie qu'elles tirent de l'oxydation des composés réduits du fluide, et qui assurent ainsi la production primaire (Jannasch et Mottl, 1985; Nelson, 1998). La réussite adaptative des invertébrés des sources hydrothermales semble être fortement liée à la mise en place de la symbiose avec certaines de ces bactéries, la biomasse de ces écosystèmes étant largement dominée par les animaux abritant des symbiontes chimiosynthétiques.

3.1 Le vestimentifère *Riftia pachyptila*

La symbiose mutualiste entre le vestimentifère *Riftia pachyptila* (vestimentifera, Sibolinidae) et le symbiote *Gammaproteobacteria* chimioautotrophes sulfo-oxydantes, *Cand. Endoriftia persephone* (Felbeck et al., 1981; Distel et al., 1988), est l'une des symbiose hauturière la plus étudiée depuis sa découverte lors des premières plongées profondes sur les sites hydrothermaux en 1977 (Cavanaugh et al., 1981; Felbeck, 1981; Jones, 1981). *Riftia pachyptila* est un ver tubicole géant surmonté d'un panache branchial rouge vif impliqué dans les échanges respiratoires. Ce ver de grande taille – il peut atteindre 2 m de long pour un diamètre de 4 à 5 cm – forme des groupes de plusieurs dizaines à plusieurs centaines d'individus à la base des cheminées hydrothermales actives de la ride Est Pacifique (Figure

24). L'acquisition du symbionte est horizontale lors des stades larvaires (Nussbaumer et al., 2006) (Figure 26). Au stade adulte le symbionte est alors incorporé dans les cellules hôtes, appelées bactériocytes situées dans le tronc du corps, dans un organe composé de plusieurs lobes : le trophosome (Bosch et al., 1984a, 1984b ; Bright et al., 2000). Le métagénome d'*Endoriftia* comprend des gènes codant pour l'oxydation du soufre et la fixation du carbone, mais également des gènes codant pour le cycle inverse de l'acide cytrique, le cycle de Calvin, la dégradation du fructose, la glycolyse, ainsi qu'un système de phosphotransférase et des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Ces derniers indiquent un style de vie hétérotrophe qui est supposé jouer un rôle en dehors de l'hôte en l'absence de sulfure (Robidart et al., 2008). Des gènes codant pour le chimiotactisme, incluant des protéines flagellaires, des régulateurs de chimiotaxie et des facteurs accessoires de la motilité nécessaires à la survie à l'extérieur de l'hôte, ont aussi été identifiés dans le métagénome (Robidart et al., 2008 ; Gardebrecht et al., 2012). L'hôte alimente les bactéries en sulfures et en oxygène prélevés au niveau de son panache branchial. Les sulfures et l'oxygène sont transportés des branchies vers le trophosome par le sang de l'hôte. Pour que ce transport soit réalisé sans que les cellules de l'hôte ne soient exposées à la toxicité des sulfures, des hémoglobines particulières sont utilisées permettant à la fois de fixer l'oxygène et les sulfures (Powell et Somero 1983 ; Zal et al., 1997 ; Bailly et al., 2002). En retour, l'hôte utilise les molécules produites par les symbiontes pour son propre métabolisme, soit directement, soit indirectement après digestion des bactéries symbiotiques (Bright et al., 2000). Dans cette symbiose, l'hôte est totalement dépendant de ses symbiontes bactériens pour vivre. Cet exemple montre également que la spécificité au niveau du/des symbionte(s) n'est pas exclusivement l'apanage des symbioses à transmission verticale.

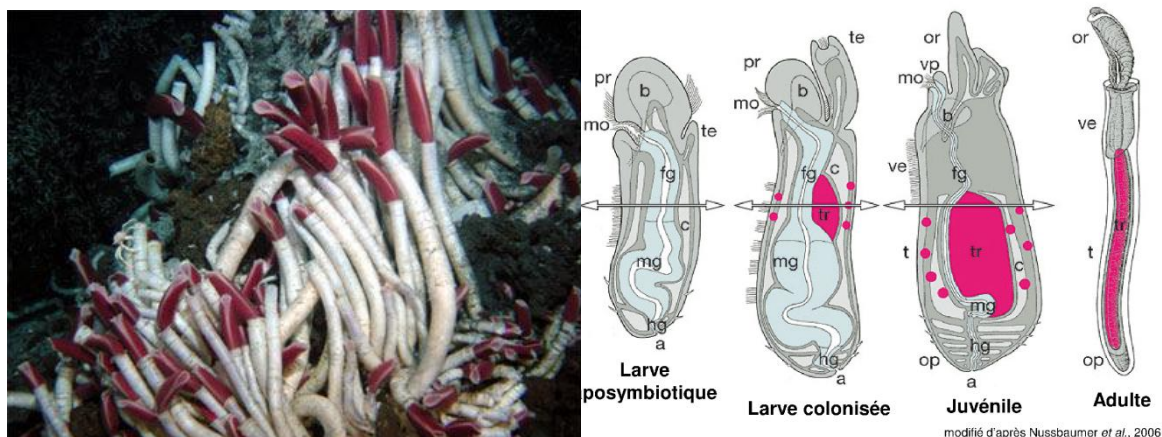


Figure 26 : Le vestimentifère *Riftia pachyptila*.

A gauche, un agrégat de vers sur un site hydrothermal de la ride Est Pacifique. A droite, schéma montrant des coupes sagittales de *R. pachyptila* au cours de son développement. La larve aposymbiotique possède un appareil digestif fonctionnel (fg, mg, hg pour « foregut, midgut, hindgut ») avec une bouche (mo) et un anus (a) ; la larve est colonisée par les symbiotes bactériens (en rose) conjointement avec la formation du trophosome (tr) ; le juvénile montre un début d'élongation du tronc (t) et le développement du panache branchial (or) ; le stade adulte présente un tronc (t), trophosome (tr) et panache branchial (or) bien différenciés. (b : cerveau ; c : coelome ; pr : prostomium ; op : opisthosome ; or : obturaculum ; te : tentacules ; ve : vestimentum ; vp : peristomium).

3.2 La moule *Bathymodiolus azoricus*

Les espèces du genre *Bathymodiolus* sont des modioles de la famille des *Mytilidae*. Ce sont des organismes filtreurs pouvant obtenir leurs nutriments directement du milieu extérieur, et sont fixés à leur substrat par le byssus. L'une des caractéristiques principales de ce genre de *Mytilidae* est leur association obligatoire avec des bactéries symbiotiques. *Bathymodiolus azoricus* est inféodée aux sources hydrothermales de la dorsale médio-Atlantique (MAR) (Von Cosel et al., 1999). Cette espèce est présente en abondance sur trois sites principaux au nord de la jonction triple des Açores : Menez Gwen (-800m), Lucky Strike (-1700m) et Rainbow (-2500m) (Figure 27).

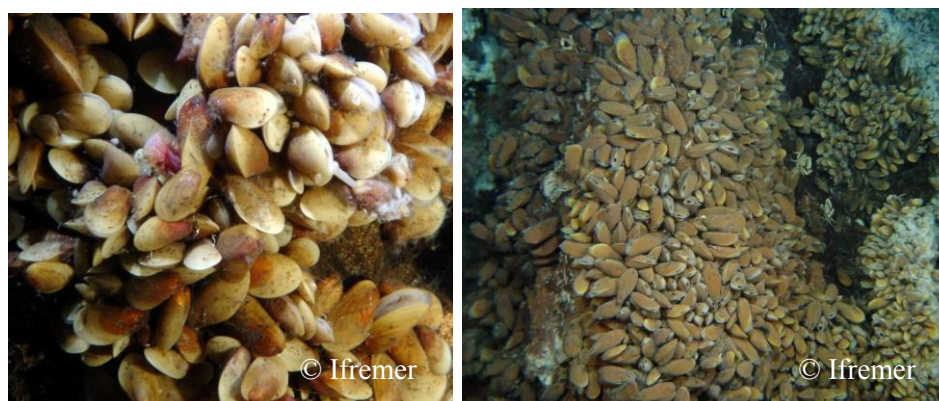


Figure 27 : *Bathymodiolus azoricus* sur le site hydrothermal Lucky Strike sur la MAR.

Bathymodiolus azoricus est, comme les autres mytilidés, un animal filtreur, possédant les organes nécessaires à ce mode de nutrition. La majorité des Bathymodiolinae, de par leur vie symbiotique, ont cependant un tube digestif réduit et droit, et des branchies hypertrophiées (Le Pennec et al., 1990). *B. azoricus* possède un tube digestif enroulé suggérant, malgré la présence de symbiotes, une activité de filtration non-négligeable. Les branchies constituent le tissu d'accueil des symbiotes, ce qui explique leur hypertrophie. Les filaments qui constituent les branchies sont divisés en trois parties : une partie ciliée terminale, une zone de transition (non-ciliée), et une zone de bactériocytes (Fiala Medioni et al., 2002; Distel et al., 1995). Les bactéries symbiotiques sont localisées dans cette troisième zone, dans la partie apicale des bactériocytes (Figure 28) (Le Pennec et Hily 1984). *Bathymodiolus azoricus* vit en double endosymbiose, hébergeant dans les bactériocytes, deux types de *Gammaprotéobacteria* (Distel et al., 1995). Celles-ci diffèrent d'un point de vue phylogénétique et physiologique (Fiala Medioni et al., 2002; Duperron et al., 2006). Les symbiotes sulfo-oxydants (SOX) sont présents chez la majorité des bivalves symbiotiques et oxydent le sulfure d'hydrogène tandis que les bactéries méthanotrophes (MOX) utilisent l'oxydation du méthane (Cavanaugh et al., 1992). Leur morphologie est elle aussi différente. Les bactéries MOX sont allongées (1,25 μm de diamètre) et présentent des membranes intra-cytoplasmiques empilées, tandis que les bactéries SOX sont de plus petite taille (0,35 μm). Ces bactéries symbiotiques sont localisées dans des vacuoles intra-cytoplasmiques au sein d'un bactériocyte, qu'elles partagent ou non (Fiala Medioni et al., 2002) (Figure 28). Cette symbiose permet donc à l'hôte d'avoir accès aux nutriments *via* ses symbiotes, ce qui ne l'empêche pas *à priori* de pouvoir filtrer les particules présentes dans son environnement (Le Pennec et Hily 1984 ; Le Pennec et al., 1990). Ce maintien des mécanismes de filtration permet en outre de nourrir les symbiotes grâce au courant d'eau généré qui apporte les composés réduits dissous dans l'eau et nécessaires au métabolisme chimiotrophe. En effet, les moules ne possèdent pas de protéines capables de fixer ou de transporter le méthane ou les sulfures et sont donc dépendantes de la diffusion de ces gaz depuis l'eau de mer jusque dans leurs branchies où résident les symbiotes. Ces derniers sont acquis par l'hôte à partir de l'environnement, par transmission horizontale. Salerno et ses collaborateurs en 2005 ont observé la présence des deux endosymbiotes dans le manteau et dans l'intestin de *B. azoricus* au stade post-larvaire et juvénile. Les auteurs ont alors suggéré une infection initiale dans le manteau puis une migration des bactéries vers les branchies (Salerno et al., 2005).

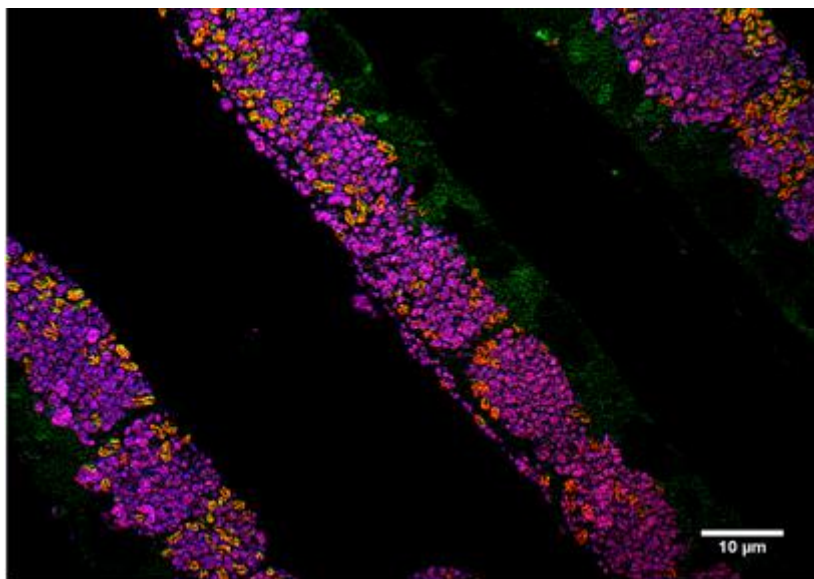


Figure 28 : Section transversale de filaments branchiaux de *Bathymodiolus azoricus* en FISH. Les bactéries sulfoxydantes sont en violet, tandis que les bactéries méthanotrophes sont en orange (Halary et al., 2008)

3.3 Le ver annélide *Alvinella pompejana*

Alvinella pompejana est un annélide Polychètes ubiquitaire des sources hydrothermales de la dorsale Est-Pacifique (Figure 29). Il forme des colonies denses sur les parois des cheminées actives à de hautes températures (Le Bris et Gaill 2007). L'environnement du ver est caractérisé par des gradients physicochimiques extrêmes, de haute pression et des sauts de températures élevées qui peuvent atteindre 105 ° C (Guirguis et Lee 2006). À ce jour, le ver de Pompéi est considéré comme l'un des métazoaires les plus eurhythmiques et thermotolérants connu sur Terre (Desbruyères et al., 1998; Pradillon et al., 2005, Ravaux et al., 2013). L'une des caractéristiques frappantes de cet annélide est son association spécifique et obligatoire avec une communauté de bactéries épibiontiques filamenteuses, qui forme un biofilm au niveau des expansions téguments dorsaux (Cary et al., 1997). De nombreuses études, y compris d'analyses métagénomiques, ont mis en évidence que cette communauté microbienne est composée d'un consortium de 12 à 15 unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) d'*Epsilonproteobacteria* (taux de similarité > 98%) (Haddad et al., 1995; Cary et al., 1997; Desbruyères et al., 1998; Campbell et al., 2001; Campbell et al., 2003, Grzymiski et al., 2008). L'analyse du métagénome a révélé la présence de gènes codant des enzymes impliquées dans le cycle rTCA au complet, la sulfo-oxydation, la dénitrification et pour des métabolismes hétérotrophes et aérobies. Ceci montre que les épibiontes semblent posséder une importante diversité métabolique et des traits adaptatifs leur permettant de s'adapter de manière optimale aux importantes fluctuations chimiques et

thermiques de l'habitat d'*Alvinella*. Enfin ces bactéries pourraient fournir à *Alvinella pompejana* une source stable de nutriments et de vitamines (Grzyski et al., 2008) et pourraient détoxifier l'environnement du ver en métaux lourds réactifs et en sulfure d'hydrogène libre (Le Bris et Gaill 2007).



Figure 29 : *Alvinella pompejana*.
A droite, photographie *in situ* sur un site de l'océan Pacifique.

IV. Notre modèle d'étude : la crevette *Rimicaris exoculata*

La crevette *Rimicaris exoculata*, décrite pour la première fois en 1986 (Williams et Rona, 1986), est une espèce des sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique (MAR), en particulier sur les sites Rainbow, Logatchev, TAG ou Snake Pit. Cette crevette est exclusivement retrouvée sur les sites hydrothermaux de la MAR pouvant être très éloignés les uns des autres, jusqu'à plusieurs centaines de kilomètres (Figure 16). L'absence de structure spatiale génétique au sein des populations de *R. exoculata*, les haplotypes (basés sur le gène COI et les microsatellites) étant retrouvés sur les sites hydrothermaux de la MAR de façon similaire, suggère une forte capacité de dispersion pour cette espèce ou un faible taux de divergence (Teixeira et al., 2011, 2012) ou une évolution très lente des marqueurs observés. Lorsqu'elle est présente cette crevette domine la macrofaune sur la grande majorité des sites qu'elle colonise. En effet elle forme d'immenses agrégats denses (2500 individus au mètre carré) (Segonzac et al., 1992, 1993; Desbruyères et al., 2001) et mobiles le long de la paroi des cheminées actives où la température est comprise entre 10 et 30°C (Schmidt et al., 2008a, 2008b) (Figure 30 et 31). La température moyenne au sein des agrégats de crevettes est comprise entre 9 et 15°C (Zbinden et al., 2004; Schmidt et al., 2008a) mais les crevettes passent parfois brièvement dans des fluides beaucoup plus chauds.



Figure 30 : Agrégat de *Rimicaris exoculata* sur le site TAG.
(Campagne BICOSE, 2014)

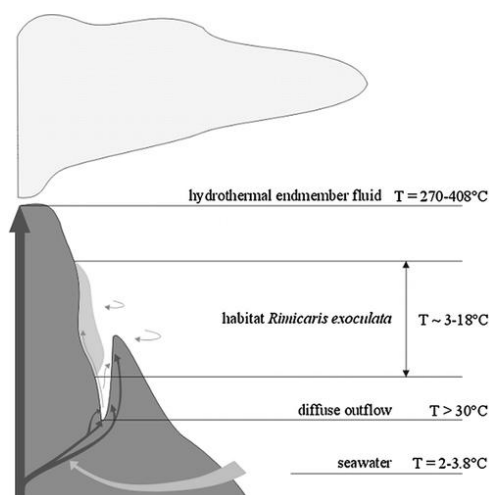


Figure 31 : Représentation schématique d'une cheminée hydrothermale colonisée par *R. exoculata*.
(Schmidt et al., 2008a)

D'autres espèces du genre *Rimicaris* ont été décrites : *Rimicaris karei* sur la rive indienne (Watabe et Hashimoto, 2002), *Rimicaris hybisae* dans la fosse de la mer des Caraïbes (Nye et al., 2011). Depuis peu (2015) *Chorocaris chacei*, crevette de la MAR vivant à proximité de *Rimicaris exoculata* a été décrite comme étant une autre espèce de *Rimicaris* : *Rimicaris chacei* (Vereshchaka et al., 2015).

1. Biologie et cycle de vie de la crevette *R. exoculata*

R. exoculata est un crustacé appartenant à l'ordre des décapodes et à la famille des *Alvinocarididae* (Williams et Rona, 1986). Comme tous les Décapodes, elle possède un exosquelette protégeant son corps découpé en segments (ou métamères), cinq paires de pattes locomotrices, un céphalothorax correspondant à la fusion des régions céphaliques et thoraciques, et un corps "comprimé" latéralement (Figure 32a). L'espèce *Rimicaris* présente des particularités qui la distinguent des autres crustacés caridés : elle ne possède ni rostre, ni yeux mais plutôt des ocelles, probablement constitués de photorécepteurs à rhodamine supposés sensibles dans les infrarouges, qui lui permettraient de capter les faibles intensités lumineuses, correspondant sans doute aux émissions thermiques (Pelli et Chamberlain, 1989; Van Dover et al., 1989; O'Neill et al., 1995; Nuckley et al., 1996; Chamberlain, 2000; Komai et Segonzac, 2008).

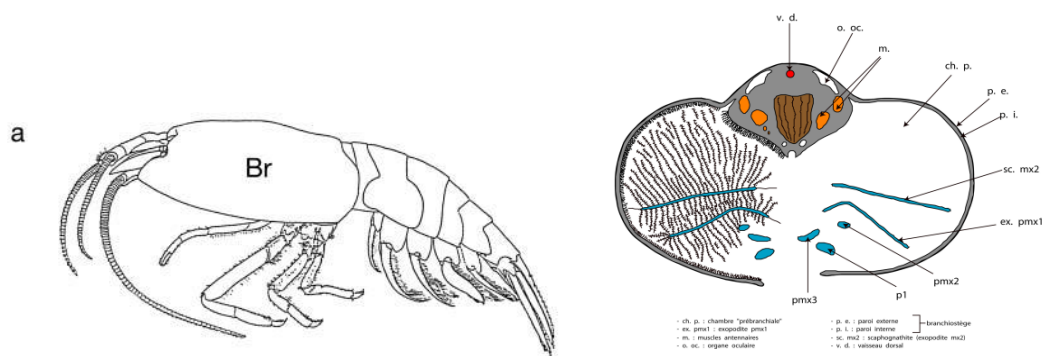


Figure 32 : *Rimicaris exoculata* (a) Vue latérale. (b) Vue interne en coupe transversale.
(a) Extrait de Williams & Rona, 1986. Br : branchiostégite (b) Extrait de Ségonzac *et al.*, 1993.

Contrairement aux autres espèces de crevettes hydrothermales, *R. exoculata* possède une cavité céphalothoracique hypertrophiée abritant une importante communauté microbienne, constituée principalement de bactéries filamenteuses (Van Dover *et al.*, 1988; Segonzac *et al.*, 1993) (Figure 33). Les branchiostégites (Br), correspondant à la carapace latérale du céphalothorax, sont incurvées et forment un microenvironnement presque clos, piégeant les appendices buccaux à l'intérieur (Figure 32b). Les parties inférieures et supérieures du céphalothorax sont séparées par deux pièces buccales : la scaphognathite (sc, en position dorsale) et l'exopodite (ex, en position ventrale). Le mouvement de battement de la scaphognathite crée un flux d'eau permettant l'irrigation des branchies (Zbinden *et al.*, 2004) (Figure 34). Suite au passage par les branchies, l'eau appauvrie en oxygène et enrichie en dioxyde de carbone est expulsée par la partie haute de la cavité. L'exopodite constitue une barrière séparant les cavités inférieures et supérieures du céphalothorax (Figure 34). Les deux pièces buccales, scaphognathite et exopodite, ainsi que la paroi interne des branchiostégites sont recouvertes de bactéries filamenteuses associées à des minéraux (Zbinden *et al.*, 2004; Corbari *et al.*, 2008a, 2008b). Cette communauté bactérienne sera décrite dans le paragraphe suivant.

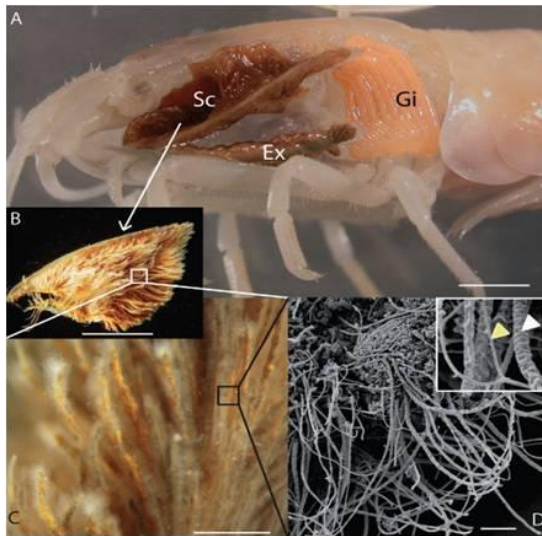


Figure 33 : Morphologie de la symbiose de la cavité céphalothoracique de *Rimicaris exoculata*. Sc : Scaphognathite ; Ex : Exopodite ; Gi : Branchies. (Petersen et al., 2010)

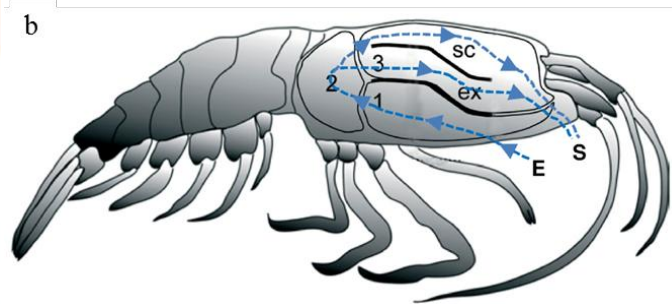


Figure 34 : Schéma montrant les mouvements d'eau permettant l'oxygénation des branchies chez *R. exoculata*. (E et S respectivement pour entrée et sortie d'eau de mer). 1 : chambre pré-branchiale inférieure ; 2 : chambre branchiale véritable (où se trouvent les branchies) ; 3 : chambre pré-branchiale supérieure (milieu enrichi en CO₂).

Les crevettes femelles adultes produisent des œufs oranges (Llodra et al., 2000; Guri et al., 2012) (Figure 35) qu'elles conservent protégés dans une gangue sous leur corps jusqu'à leur éclosion (Guri et al., 2012). Une femelle pourrait porter jusqu'à 800 œufs, de taille variant de 300 à 400 µm (Tyler et Young, 1999). Seule la campagne SERPENTINE en mars 2007 avait permis l'observation de quelques femelles gravides dans les agrégats de crevettes sur un fumeur noir du site Logatchev (Guri et al., 2012). La campagne BICOSE menée en janvier 2014 sur les sites TAG et Snake Pit, a permis de mettre en évidence un nombre très important de femelles gravides dans les agrégats. Ces observations viennent contredire l'hypothèse précédente selon laquelle les femelles s'éloigneraient des agrégats de crevettes en zone hydrothermale active afin de protéger le développement des œufs (Tyler et Young, 1999) et suggère une saisonnalité dans le cycle de reproduction chez *R. exoculata* (Hernandez et al., in prep).

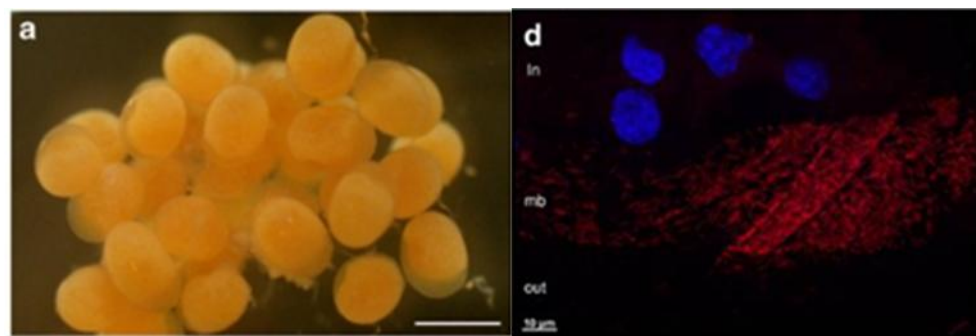


Figure 35 : (a) Œufs de *R. exoculata*. Echelle : 500 μ m. (d) Membrane des œufs (mb) avec épibiontes, le contenu de l'œuf (en) et l'environnement extérieur (out). Les *Gammaproteobacteria* (rouge) ont été hybridés avec une sonde GAM42a. La coloration au DAPI est en bleu, montrant le noyau eucaryote de l'œuf. (Guri et al., 2012).

Guri et ses collaborateurs ont décrit pour la première fois la présence de la communauté symbiotique associée aux œufs (Figures 35) (Guri et al., 2012), mais qui ne semble pas être retrouvée au niveau des premiers stades larvaires (Hernandez et al., 2015).

Une étude récente a permis de décrire pour la première fois les premiers stades larvaires (zoé I) de *R. exoculata* (Figure 36) (Hernandez et al., 2015). Ces larves ont été récupérées dans la colonne d'eau à proximité des agrégats et sur des femelles dont les œufs venaient d'éclore. Ces premiers stades larvaires présentent des caractéristiques particulières telles que le manque notoire de développement de certaines pièces buccales et quelques soies dans la partie interne des maxillipèdes. L'absence à la fois de processus masticatoires des mandibules et la setation des pièces buccales suggèrent que le premier stade larvaire est incapable de capturer et de manipuler des aliments. Bien que la taille des œufs soit relativement petite pour permettre l'apparition de larves lécithotrophes (Bauer 2004), ces larves semblent se nourrir grâce à leur réserve lipidique. La présence de réserves lipidiques est plutôt répandue chez les larves de décapodes (Anger 2001), mais la suppression des structures permettant l'alimentation est rare. Ce modèle larvaire est adapté à une grande dispersion dans l'environnement bathypélagique oligotrophe ce qui lui permettrait de coloniser des habitats fragmentés tels que les cheminées hydrothermales.

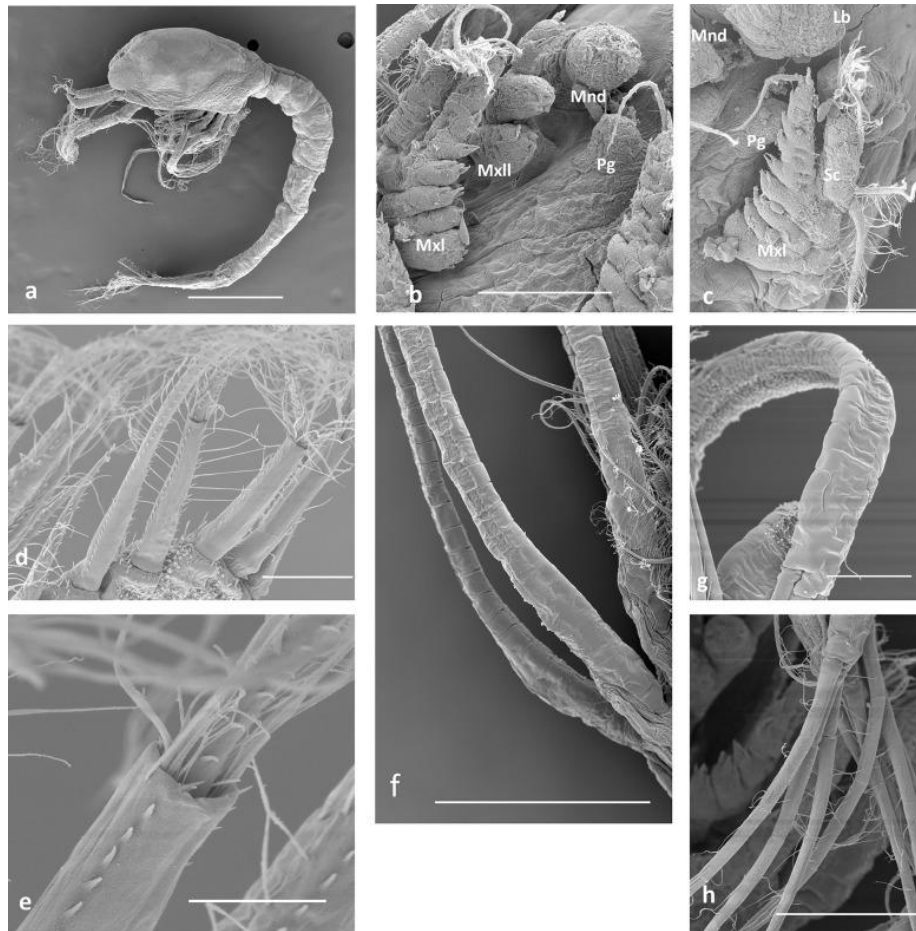


Figure 36: Images de microscopie électronique de larve de zoé I de *Rimicaris exoculata* (Hernandez et al., 2015) (a) vue latérales. (b, c) pièces buccales; Mnd, mandibule; Mxll, maxillule; Mxl, maxilla; Pg, paragnathe; Lb, labrum. (d, e) soie plumodenticulate du telson. (f) exopode des maxillipèdes 1 à 3 de *Mirocaris fortunata*. (g, h) exopode du second maxillipède et soies distales.

Ces larves de *R. exoculata* pourraient alors coloniser d'autres sites en suivant les courants marins comme c'est le cas pour de nombreux invertébrés marins profonds (Marsh et al., 2001). Une hypothèse serait que les larves après l'éclosion remontent dans la colonne d'eau depuis leur site hydrothermal d'éclosion et qu'elles s'installent sur un site au premier stade juvénile (Pond et al., 1997, 2000; Herring et Dixon, 1998).

Concernant les stades juvéniles, des spécimens ont été observés au niveau des cheminées, regroupés à l'écart par rapport aux adultes. Ces observations ont été effectuées sur le site hydrothermal Logatchev (Campagne SERPENTINE, 2007), TAG et Snake Pit (Campagne BICOSE, 2014). Les juvéniles qui ont pu être collectés mesurent entre 1,2 cm pour le plus petit à 4,5 cm pour le plus grand. On distingue quatre stades juvéniles distincts, nommés de A à D, définis principalement à partir du nombre d'épines sur le telson et de la longueur de la carapace (Komai et Segonzac, 2008). Le céphalothorax des juvéniles

représente un peu plus d'un tiers de la longueur total du corps. Les juvéniles possèdent une coloration orange correspondant à d'importantes réserves lipidiques riches en caroténoïdes supposées d'origine photosynthétique (Pond et al., 1997, 2000; Allen et al., 2001) (Figure 37a). La proportion de ces réserves diminue au fil des mues et du développement morphologique des juvéniles, jusqu'à disparaître au stade adulte de la crevette. Au stade adulte, les spécimens de *R. exoculata* peuvent atteindre 6 cm de long dont près de la moitié correspond à la cavité céphalothoracique (Figure 37b).



Figure 37 : (a) Juvéniles de *R. exoculata*. (b) *R. exoculata* adulte (campagne BICOSE 2014)
Les longueurs des spécimens sont cohérentes avec les tailles réelles.

Comme l'ensemble des arthropodes, la crevette *R. exoculata* subit la mue, aussi appelée exuviation. Cette dernière nécessite une importante quantité d'énergie pour les crevettes. Parmi les différentes phases de la mue, la phase de repos tégumentaire correspond à la période nécessaire pour la crevette de refaire ses réserves pour la prochaine mue. Cette période est variable selon les espèces d'arthropodes. Le cycle de mue de *R. exoculata*, estimé à 10 jours, est beaucoup plus rapide que la plupart des espèces de crevette, tel que la crevette littorale *Macrobrachium rosenbergii* (41 à 91 jours) (Corbari et al., 2008b). Le cycle de mue de *R. exoculata* est à mettre en relation avec la coloration que prennent les crevettes due à l'accumulation de minéraux dans leur céphalothorax. Au cours de la mue les pièces buccales et la paroi interne du céphalothorax, les branchiostégites, se recouvrent progressivement de minéraux tels des oxydes de fer sur le site Rainbow, donnant une couleur « rouille » (orange puis rouge) au céphalothorax des crevettes (Figure 38), ou encore tels des sulfates de fer pour le site TAG ou Snake Pit, donnant cette fois une couleur grise puis noire en fin de cycle de mue (Zbinden et al., 2004; Corbari et al., 2008a, 2008b). Lors de la mue, l'élimination de la croûte de minéraux et des bactéries associées au céphalothorax (*cf.* ci-après) donne aux crevettes une couleur blanche. La recolonisation par les bactéries se fait conjointement avec la précipitation des minéraux selon des étapes précises (*cf.* section IV3.3) (Figure 38) (Corbari et al., 2008a, 2008b).

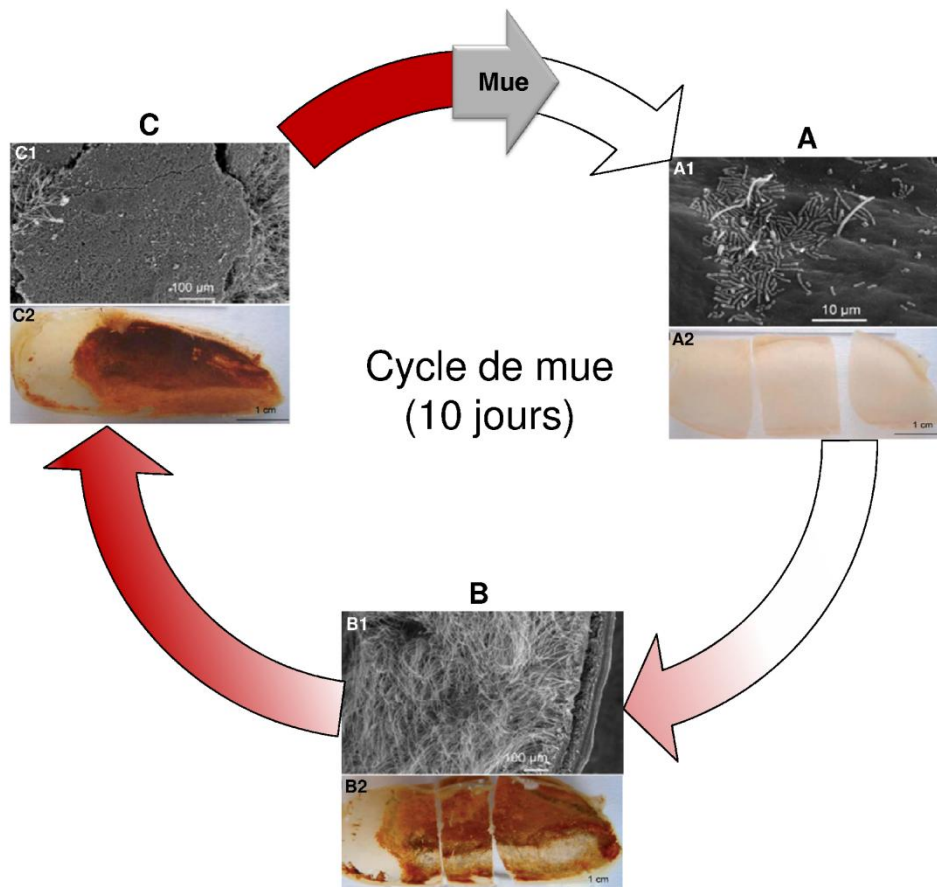


Figure 38 : Schéma du cycle de mue de *Rimicaris exoculata* montrant une vue interne des branchiostégites (Br) à différentes phases du cycle (A1, B1, C1 : microscopie électronique à balayage ; A2, B2, C2 : photographies) (Corbari et al., 2008)

A. **Phase post-ecdysiale** (après la mue). A2 : Br sans minéraux ; A1 : début de colonisation par des bacilles et des bactéries filamenteuses.

B. **Phase pré-ecdysiale précoce** (environ au milieu du cycle). B2 : Br avec minéraux (coloration rouge correspondant à des oxydes de fer) ; B1 : Br colonisée par de nombreuses bactéries filamenteuses.

C. **Phase pré-ecdysiale avancée** (avant la mue). C2 : Br avec une croûte d'oxyde de fer. C1 : les bactéries filamenteuses sont véritablement recouvertes par les minéraux.

Le mode de nutrition de la crevette n'est pas totalement élucidé. Bien que *R. exoculata* soit un animal et donc hétérotrophe, celle-ci n'est ni prédatrice ni nécrophage. Différentes hypothèses quant à son mode de nutrition ont été émises : (i) les microorganismes présents sur les parois des cheminées ou dans l'eau environnante pourraient constituer une source nutritionnelle (Van Dover et al., 1988), mais cette hypothèse a été en partie réfutée par des analyses isotopiques au $\delta^{13}\text{C}$ (Polz et al., 1998) indiquant qu'ils ne peuvent être la source nutritive exclusive; (ii) l'ingestion directe des épibiontes du céphalothorax (Casanova et al., 1993; Segonzac et al., 1993; Polz et Cavanaugh, 1995) ; (iii) ou l'utilisation des molécules organiques synthétisées par les bactéries et transférées à travers la cuticule interne des branchiostégites (Zbinden et al., 2004; Corbari et al., 2008b) pourraient être des sources

nutritives supplémentaires ; (iv) une dernière hypothèse serait le rôle de la communauté microbienne spécifique du tube digestif (Polz et al., 1998; Pond et al., 2000; Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003; Zbinden et al., 2004; Durand et al., 2010). L'hypothèse (iii) a très récemment été appuyée par une étude utilisant des composés radioactifs, ayant permis de démontrer un transfert de molécules carbonées, tels la lysine ou l'acétate, des épibiontes vers la crevette à travers le tégument (cf section IV.3.2). (Ponsard et al., 2013). Plutôt qu'une unique source nutritive, l'ensemble de ces sources potentielles pourraient contribuer à la nutrition de la crevette

2. La symbiose du tractus digestif

En plus d'une hypertrophie de sa cavité céphalothoracique, *R. exoculata* possède un appareil digestif particulier. La taille de l'estomac est réduite proportionnellement à la longueur de la crevette. Les parties du tube digestif appelées stomodeum (estomac) et proctodeum (zone terminale d'excrétion) sont également plus courtes que chez la plupart des crustacés alors que la partie du mésentéron constitue au contraire les deux tiers du tube digestif (Komai et Segonzac, 2008) au lieu d'un sixième chez la majorité des crustacés (Milne-Edwards, 1840) (Figure 39). Cette partie du tractus digestif n'est pas soumise au phénomène de mue.

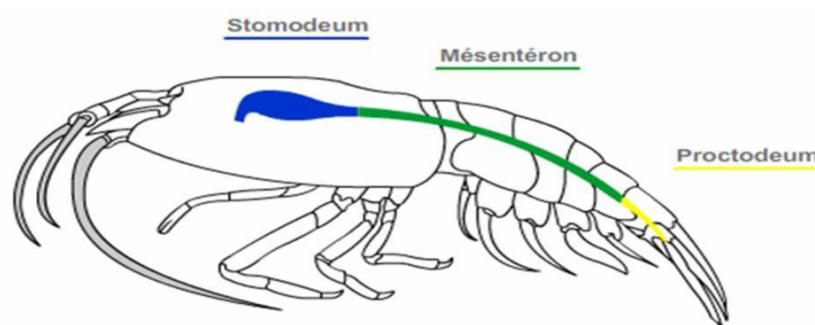


Figure 39 : Représentation schématique des trois portions du tube digestif de *R. exoculata*.
(Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003)

Le contenu de l'intestin est composé en majorité d'éléments minéraux (sulfures et oxydes de fer) d'origine probablement hydrothermale et de quelques fragments de cuticules qui proviendraient de l'ingestion des exuvies des crevettes environnantes (Casanova et al., 1993; Segonzac et al., 1993).

C'est en 1998 que la présence probable d'une communauté microbienne a été montrée par l'utilisation de marqueurs isotopiques qui révéla une fixation significative de carbone dans des extraits de tube digestif (Polz et al., 1998). Cette communauté bactérienne, distincte de celle du céphalothorax et de l'environnement, fut par la suite mise en évidence de manière plus précise dans le mésentéron (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003). Les premières études génétiques basées sur les séquences du gène de la petite sous-unité ribosomal bactérienne (ARNr 16S), ont révélé trois phyla principaux : les *Epsilonproteobacteria*, les Entomoplasmatales et les Deferribacterales (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003). Des analyses suivantes ont permis de montrer la présence d'un phylum plus large que les Entomoplasmatales, celui des Mollicutes ainsi que le groupe des *Gammaproteobacteria* (Durand et al., 2010). La présence de séquences affiliées à des groupes non retrouvés dans le milieu environnant, tels qu'un groupe de *Geovibrio* affilié à des puits de pétrole en eau douce, et leur pérennité suite à un jeûne long (de 72 heures), suggèrent qu'il s'agirait d'une communauté microbienne spécifique (Durand et al., 2010).

L'étude de Durand et al. (2010) met en évidence, d'après des observations microscopiques, que les bactéries tapissent la paroi interne du tractus digestif. De longs filaments très fins sont insérés entre les microvillosités des cellules épithéliales du tube digestif (Figure 40) et séparés du bol alimentaire par la membrane péritrophique. Ces filaments semblent correspondre à des cellules uniques, les septums étant non visibles.

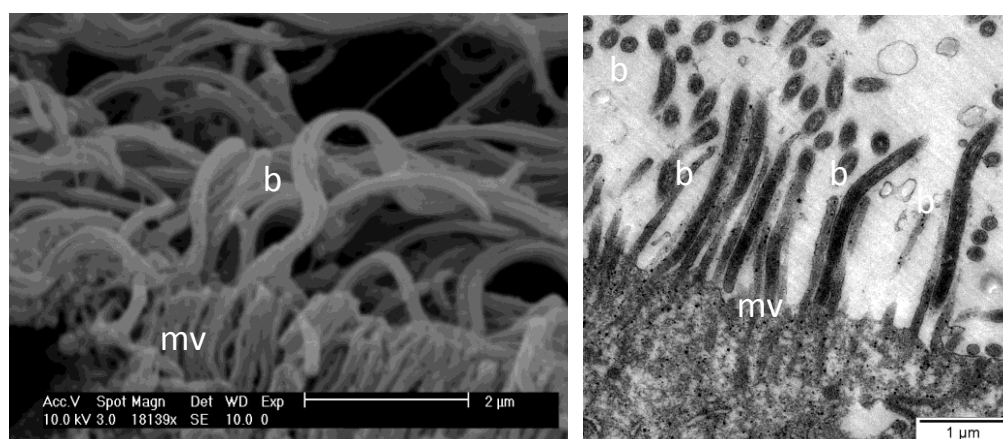


Figure 40 : Images de microscopie électronique de la paroi du tube digestif de *R. exoculata*. mv : microvillosités des cellules épithéliales de la paroi du tube digestif. b : bactérie(s). (a) MEB. Extrait de Durand et al., 2010. (b) MET. Données M. Zbinden, AMEX, CNRS, 2009.

Grâce à des hybridations *in situ*, ces filaments ont été identifiés comme étant des bactéries actives (Figure 41). La partie du tube digestif colonisée par ces bactéries n'étant pas soumise à la mue, celles-ci peuvent s'installer de façon durable et interagir avec leur hôte.

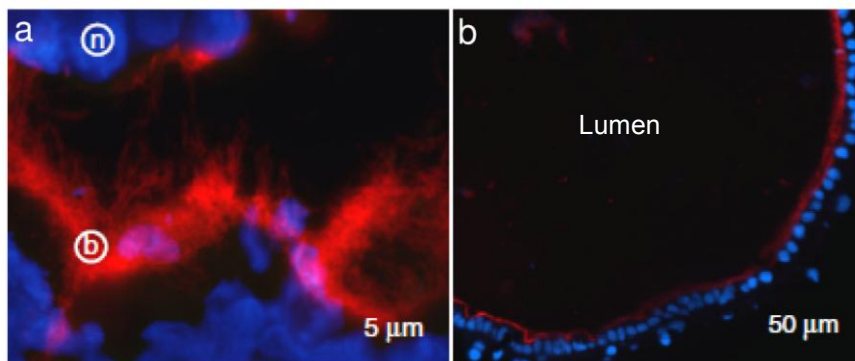


Figure 41 : Observation d'épibiontes du tube digestif d'un spécimen de *R. exoculata* de Rainbow ayant subi un jeûne long. (a) et (b) : observation en fluorescence après hybridation *in situ* (FISH) en utilisant la sonde Eub338 marquée en Cy3, l'ADN eucaryote (noyau) est marqué en bleu (DAPI) (n : nucleus ; b : bacteria ; mv : microvillosité ; lumen : intérieur du tube digestif). Epibiontes bactériens (en rouge) insérés entre les microvillosités de l'intestin d'une crevette. (modifié d'après Durand *et al.*, 2010)

Cependant, l'acquisition et la transmission de la microflore intestinale demeurent inconnues. Plusieurs hypothèses ont pourtant été émises : (i) les bactéries pourraient être acquises à partir de l'environnement, cependant certaines souches affiliées aux *Deferribacteres* et aux *Mollicutes* n'ont jamais été retrouvées dans l'eau environnante ; (ii) un transfert horizontal de bactéries entre les individus est envisagé, les bactéries sont présentes entre la membrane péritrophique et la paroi du tube digestif mais pourraient traverser cette membrane et être transférées par les fèces ; (iii) une transmission verticale des parents à leur descendance est également évoquée, bien qu'il n'a pas été confirmé la présence de cette microflore chez les larves et les juvéniles.

L'étude du bol alimentaire a montré la présence d'autres microorganismes, de type bacilles ou coques, dont certains appartiennent au phylum des Archées (Durand *et al.*, 2010). Cependant, ceux-ci semblent ingérés de façon aspécifique avec l'eau environnante et les minéraux présents sur les cheminées des sources hydrothermales, puis éliminés par les fèces.

Afin de distinguer les communautés bactériennes spécifiques de la communauté microbienne du tube digestif, des expériences de jeûne, pendant 8, 22 ou 72 heures, ont été réalisées en incubateur pressurisé IPOCAMP™ (Shillito *et al.*, 2001), afin de vider le tube digestif de son contenu. Ces expériences ont permis de confirmer la présence des phyla

Gammaproteobacteria, Mollicutes (dont les Entomoplasmatales) et *Epsilonproteobacteria* au sein de la communauté microbienne spécifique (Durand et al., 2010). Le phylum des *Deferribacteres* est également présent en moindre proportion par rapport aux analyses réalisées sur une crevette n'ayant pas subi de jeûne (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003; Durand et al., 2010). Une partie des *Deferribacteres* disparaîtrait lors d'un jeûne long de 72 heures. Plusieurs hypothèses peuvent l'expliquer : (i) les *Deferribacteres* dépendent des apports en minéraux, notamment en fer et en sulfures, du bol alimentaire ; (ii) elles peuvent être présentes de façon libre dans l'estomac et seraient éliminées avec le bol alimentaire ; (iii) elles pourraient également être strictement hétérotrophes et dépendre de la matière organique présente dans le bol alimentaire (Durand et al., 2010).

La comparaison des communautés bactériennes associées au tractus digestif de spécimens de *R. exoculata* provenant de différents sites de la MAR a été réalisée récemment (Durand et al., 2015). Cette étude montre que l'épibionte filamenteux, décrit auparavant dans l'article de Durand et al. (2010) pour les sites TAG et Rainbow, est également retrouvé dans le tractus digestif des spécimens des autres sites et représente toujours le morphotype dominant.

Les analyses moléculaires mettent en revanche en évidence l'existence de plusieurs populations. Les premières populations sont constituées de plusieurs phylotypes de *Gammaproteobacteria* et d'*Epsilonproteobacteria*, retrouvés sur tous les sites, pouvant donc être des phylotypes allochtones. Ces populations correspondent à des phylotypes proches phylogénétiquement des épibiontes du céphalothorax et à des clones environnementaux indiquant que ces bactéries pourraient être acquises et sélectionnées depuis l'environnement. La dernière population est constituée des *Deferribacteres* et des Mollicutes, spécifiques à la symbiose de *R. exoculata* (c'est-à-dire autochtones) car non retrouvées dans l'environnement. Ces phylotypes sont retrouvés quel que soit le site d'origine. Ils semblent être très conservés (>99 %) ce qui indiquerait une forte co-évolution entre la crevette hôte et ses épibiontes (*Deferribacteres* et Mollicutes). Par conséquent, ces phylotypes pourraient être transmis de manière verticale (ou mixte) des crevettes femelles à leur progéniture.

De plus, la reconstruction de réseaux des relations évolutives pour les épibiontes résidents affiliés aux *Deferribacteres* et aux Mollicutes suggère une histoire évolutive en fonction du site. Les spécimens du site Rainbow semblent présenter une particularité taxonomique suggérant une histoire évolutive plus ancienne, ainsi qu'une population d'épibiontes en expansion ; tandis que les sites Logatchev et Ashadze sembleraient avoir été

colonisés plus récemment par *R. exoculata*, comme indiqué par la faible divergence observée entre les épibiontes.

3. La symbiose du céphalothorax

3.1 Une communauté complexe et organisée

La colonisation microbienne des pièces buccales et de la paroi interne des branchiostégites du céphalothorax a été démontrée par de nombreuses études (Van Dover et al., 1988; Casanova et al., 1993; Segonzac et al., 1993; Polz et Cavanaugh, 1995; Zbinden et al., 2004, 2008; Corbari et al., 2008b). Les premières études de Polz et Cavanaugh (1995) concluent, à partir de spécimens du site hydrothermal basaltique Snake Pit situé sur la MAR, que ces épibiontes appartiendraient à un unique phylotype d'*Epsilonproteobacteria*. Par la suite plusieurs études ont permis la mise en évidence de plusieurs phylotypes bactériens affiliés au phylum des *Proteobacteria* : des *Epsilonproteobacteria*, des *Gammaproteobacteria*, des *Alphaproteobacteria*, des *Deltaproteobacteria*, et des *Bacteroidetes*, ces trois derniers phylotypes bactériens étant peu représentés (Figure 42) (Zbinden et al., 2008, Hügler et al., 2011; Petersen et al., 2010). Une étude récente menée sur le métagénome des symbiontes du céphalothorax (Jan et al., 2014) a permis la découverte du nouveau phylum des *Zetaproteobacteria*, incluant des bactéries ferro-oxydantes strictes telle que *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1 (Emerson et al., 2007; Singer et al., 2011), dont la présence dans le céphalothorax a été confirmée par hybridations *in situ* en fluorescence (FISH). Ces bactéries ferro-oxydantes pourraient jouer un rôle majeur dans le dépôt de minéraux oxydés de Fer. De manière globale la communauté du céphalothorax comporte deux grandes lignées de symbiontes (Figure 42) : les *Epsilonproteobacteria* affiliées à la souche *Sulfurovum lithotrophicum* qui contient plusieurs écotypes, et les *Gammaproteobacteria* affilié à la souche *Leucothrix mucor* qui contient elle aussi plusieurs écotypes. Ceci suggère une réelle stabilité génétique au sein des communautés symbiotiques du céphalothorax, ou que le marqueur ARNr 16S utilisé pour la phylogénie n'est pas assez divergent pour refléter les variations des communautés en fonctions des écotypes.

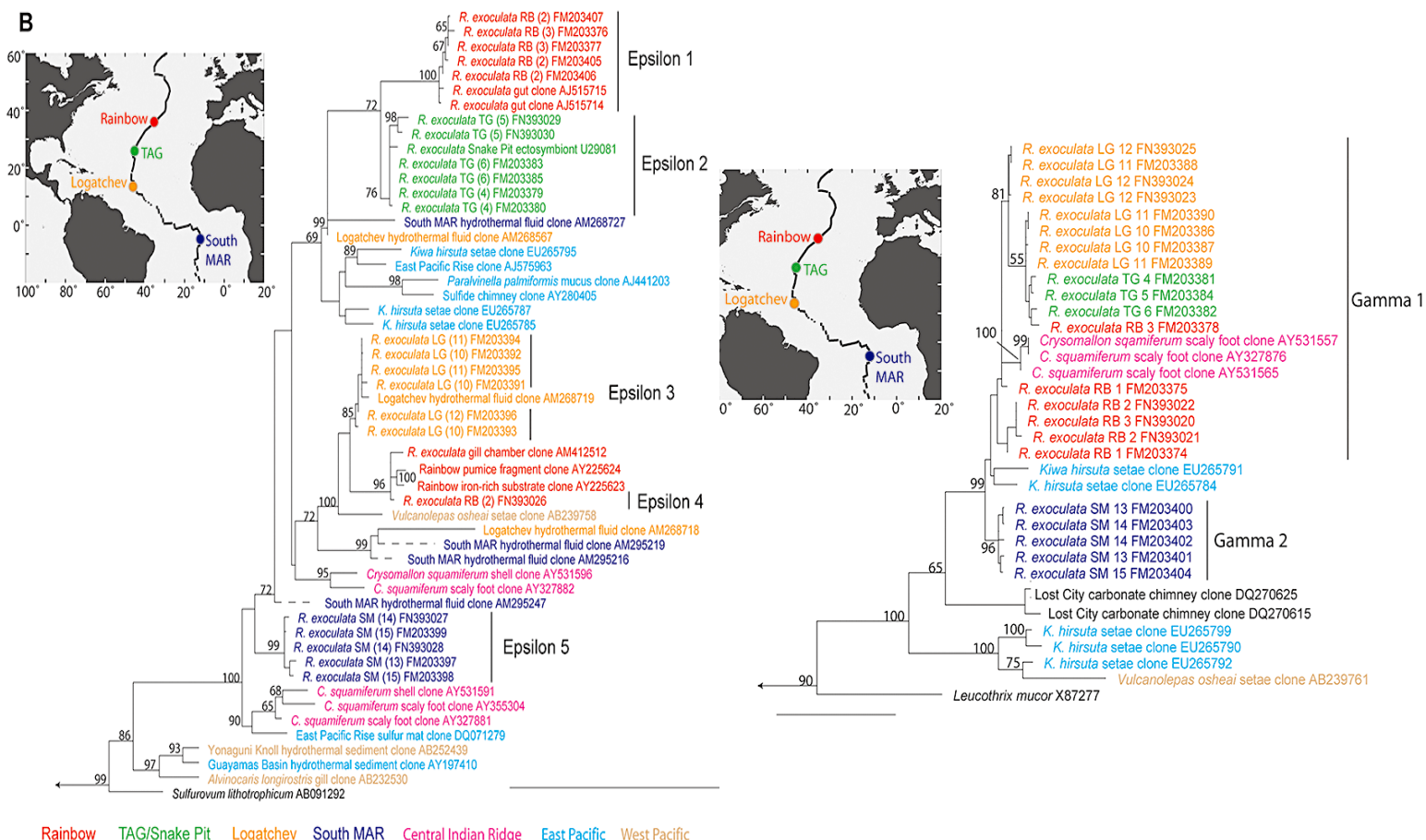


Figure 42 : Arbres phylogénétiques des séquences d'ARNr 16S des épibiontes *Epsilon*- et *Gammaproteobactériens* de *R. exoculata*, basés sur la méthode du Maximum Likelihood. L'outgroup utilisé est l'Alphaprotéobactérie *Rhodocyclus tenuis* (D16208). (Petersen et al., 2010)

Les observations microscopiques des épibiontes ont montré l'existence de plusieurs types morphologiques : des filaments épais, des filaments fins, des bacilles et des coques (ces derniers possédants des membranes internes) ; certains de ces épibiontes sont associés à des oxydes de fer (Figure 43). Ces différentes observations laissent à penser à l'occurrence, outre de différents phylotypes, de différents métabolismes (Zbinden et al., 2004, 2008; Corbari et al., 2008b).

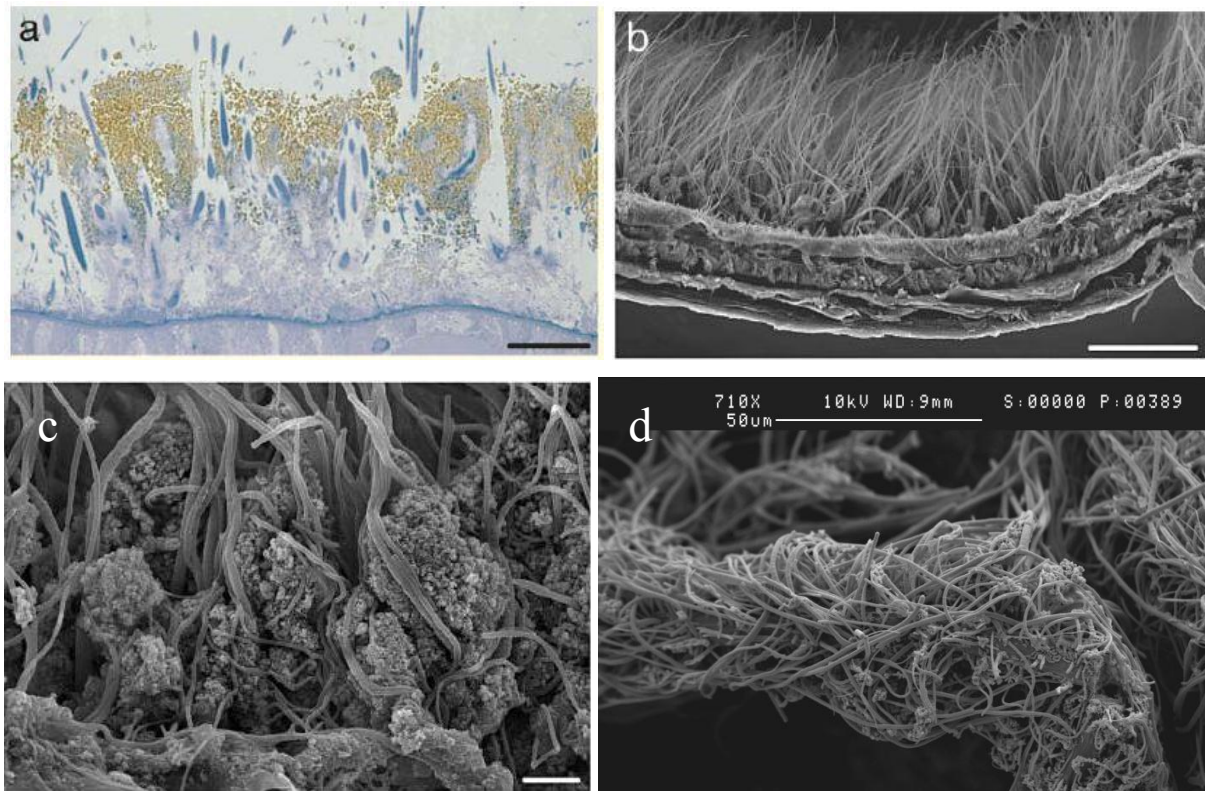


Figure 43 : *Rimicaris exoculata*. Images prises en microscopie photonique et MEB.

(a) Coupe fine de branchiostégite. Les bactéries, correspondant aux bacilles et filaments bleus, sont situées dans une couche d'oxydes de fer en jaune. (b) Coupe transversale de branchiostégite au MEB. La surface interne est recouverte de longs filaments bactériens. (c) Agrandissement sur la surface interne d'une branchiostégite au MEB. De nombreux oxydes de fer se sont accumulés entre les bactéries filamenteuses et bacilles. (d) Soie bactériophore de scaphognathite vue au MEB. De longs filaments bactériens recouvrent la soie. (a, b, c) Extraits de Zbinden *et al.*, 2004. Echelles : 50 μ m, 100 μ m et 10 μ m. (d) Données C. Jan, UMR 6197, 2008.

La dominance de bactéries affiliées aux classes des *Epsilon*- et *Gammaproteobacteria* a été démontrée par des études d'hybridations *in situ* en fluorescence (FISH) réalisées sur des crevettes provenant de plusieurs sites hydrothermaux de la MAR (Petersen *et al.*, 2010; Hügler *et al.*, 2011; Guri *et al.*, 2012) (Figure 44).

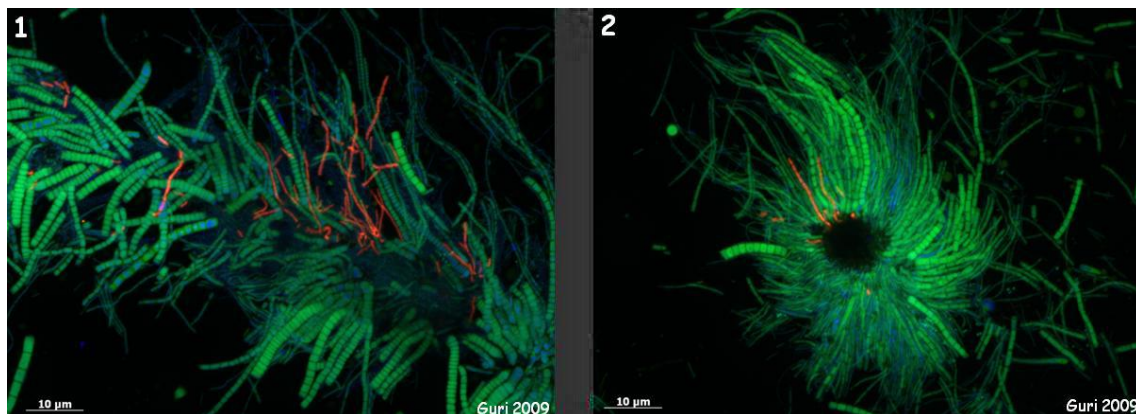


Figure 44 : Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur des soies bactériophores de scaphognathite de *Rimicaris exoculata*. En rouge, les filaments fins *Gammaproteobacteria* (sonde Gam42a). En vert, les filaments épais *Epsilonproteobacteria* (sonde Epsi549) (Guri *et al.*, 2012)

3.2 Rôle trophique

Une étude très récente a permis d'appuyer l'implication trophique des épibiontes du céphalothorax pour *R. exoculata* (Ponsard et al., 2013). Des expériences *in vivo* ont été menées en aquarium pressurisé avec du carbone inorganique marqué avec des isotopes ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ et $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) en présence de deux donneurs d'électrons différents ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ et Fe^{2+}). Afin d'imiter le transfert de petites molécules des bactéries épibiontiques vers l'hôte des composés organiques radiomarqués (^{14}C -acetate et ^3H -lysine) ont été choisis comme sous-produits métaboliques et/ou potentiels substrats pour les bactéries. Cette étude a permis de montrer que les épibiontes assimilent le carbone inorganique par chimioautotrophie. Les filaments épais *Epsilonproteobacteria* semblent être polyvalents et capables de changer de donneurs d'électrons, incluant des composés organiques (utilisation hétérotrophique de l'acétate et de la lysine). Les filaments fins de *Gammaproteobacteria* semblent également capables de stocker de l'énergie qui pourrait alimenter le métabolisme chimiosynthétique pendant plusieurs heures sous des conditions de privation en donneur d'électrons. Enfin le transfert direct d'éléments nutritifs de la bactérie à l'hôte a également été démontré. L'importation des produits solubles d'origine bactérienne se produit à travers le tégument des branchiostégites de la cavité céphalothoracique, plutôt que par le tube digestif (Figure 45). L'association entre *R. exoculata* et ses épibiontes apparaît donc comme une véritable association mutualiste.

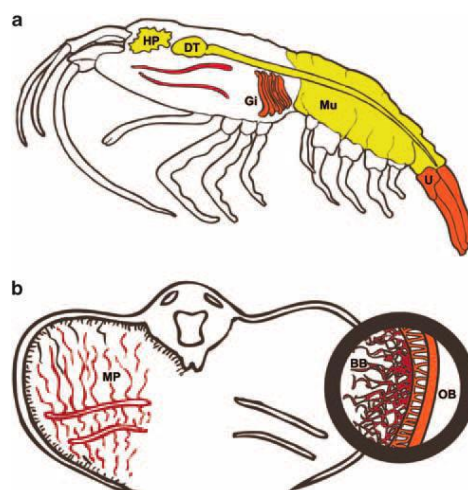


Figure 45 : Vue schématique de *R. exoculata* (a) et de sa cavité céphalothoracique en coupe transversale (b) montrant les taux d'incorporation du ^{14}C dans les organes internes de la crevette (Ponsard et al., 2013). Le taux d'incorporation est représenté en fonction de la couleur, le rouge correspond au plus fort taux et le jaune au plus faible taux. HP : Hépatopancréas ; DT : Estomac et tube digestif ; GI : Branchies ; Mu : Muscles ; U : Uropodes ; MP : Pièces buccales (scaphognathite et exopodite) ; BB : Biofilm bactérien ; OB : Branchiostégite.

Cette première démonstration de ces capacités chez un crustacé décapode soutient l'hypothèse précédemment rejetée de l'absorption transtégumentaire de la matière organique dissoute ou du carbone comme voie nutritionnelle pour la crevette (Ponsard et al., 2013). Bien que plusieurs souches d'*Epsilon*- ou *Gammaproteobacteria* proche phylogénétiquement des épibiontes aient pu être cultivées (Janvier et al., 1985; Inagaki et al., 2004; Takai et al., 2006; Yamamoto et al., 2010), les tentatives de culture des épibiontes associés à *R. exoculata* menées au laboratoire LM2E et ailleurs restent à ce jour infructueuses.

3.3 Une communauté aux fonctions diverses

Une étude récente menée sur le métagénome des symbiontes du céphalothorax a permis de mieux comprendre le fonctionnement de cette communauté et des possibles interactions réalisées entre l'hôte et ses symbiontes (Jan et al., 2014). Des premières études menées sur les symbiontes du céphalothorax ont mis en évidence de gènes de fonction suggérant l'utilisation de plusieurs voies métaboliques dont la réduction de composés soufrés ou sulfo-oxydation (gènes *AprA*, *APS* et *soxB*), la méthanotrophie (gène *pmoA*) et l'utilisation de l'hydrogène (gène *hupL*) (Zbinden et al., 2008; Hügler et al., 2011; Petersen et al., 2011, Guri et al., 2012). La détection et l'affiliation de gènes impliqués dans le cycle inverse de l'acide citrique (rTCA) (gène *aclB*) et du cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB) (gène *cbmM*) a donné les premières indications que les principaux épibiontes (*Epsilon*- et *Gammaproteobacteria*) sont bien chimiolithoautotrophes (Hügler et al., 2011), appuyée par les approches *in vivo* (Ponsard et al., 2013).

En l'absence de culture des symbiontes, une étude récente a été réalisée sur le métagénome des symbiotes du céphalothorax (Jan et al., 2014). Pour cela, l'ensemble des génomes des symbiontes du céphalothorax a été extrait puis séquencé par la technique du 454. Les séquences ont ensuite été triées par 'taxobin' via l'utilisation de 5 logiciels (Jan et al., 2014). Chaque taxobin représente une lignée microbienne, comme par exemple les epsilonprotéobactéria, et ne distingue pas différentes lignées très proches entre elles. Les résultats ne sont donc pas des génomes purs mais plutôt une sorte de métagénome par lignée. Ce travail a permis de confirmer les hypothèses précédentes concernant les métabolismes en présence au sein de la communauté bactérienne symbiotique du céphalothorax de *R. exoculata* (Zbinden et al., 2008; Hügler et al., 2011; Petersen et al., 2011; Guri et al., 2012; Ponsard et

al., 2013). Un fonctionnement métabolique théorique a pu ainsi être reconstruit pour chacune des deux principales classes d'épibiontes, les *Epsilon*- et *Gammaproteobacteria* (Figure 46). Ainsi des gènes impliqués dans la voie Sox ont été retrouvés dans les deux principales classes d'épibiontes, les *Epsilon*- et *Gammaproteobacteria*, confirmant leur caractère sulfo-oxydants (Jan et al., 2014). Cependant, bien que ces deux groupes d'épibiontes soient tout deux des bactéries sulfo-oxydantes, ils n'utilisent pas la même voie de fixation autotrophe du carbone. Les *Epsilonproteobacteria* utilisent le cycle inverse des acides tricarboxyliques (rTCA), alors que les *Gammaproteobacteria* utilisent le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB). La présence d'épibiontes utilisant deux voies de fixation du carbone différentes ayant des capacités énergétiques différentes pourrait constituer un avantage (notamment sélectif) pour l'hôte *R. exoculata*. En effet la présence de ces deux types d'épibiontes pourrait conférer à la crevette une meilleure adaptation aux conditions fluctuantes de l'environnement hydrothermal.

Outre le soufre, il a été montré que l'hydrogène pourrait également être utilisé par les deux groupes d'épibiontes comme donneur d'électrons, et les composés soufrés comme accepteur d'électrons. De plus, il a été mis en évidence la présence des voies de dénitrification et d'ammonification complètes chez les *Epsilonproteobacteria*, avec deux systèmes distincts (cytoplasmique et périplasmique) pour la réduction du nitrate, ce qui suppose une tolérance à l'anaérobie.

L'ensemble des gènes métaboliques mis en évidence indique que ces épibiontes sont capables d'utiliser de multiples donneurs et accepteurs d'électrons et, sans doute, d'adapter leur métabolisme en fonction des variations environnementales. Ils seraient également capables de s'adapter aux fluctuations de température et aux divers stress liés à l'hydrothermalisme (mise en évidence notamment de gènes codant pour des protéines Hsp).

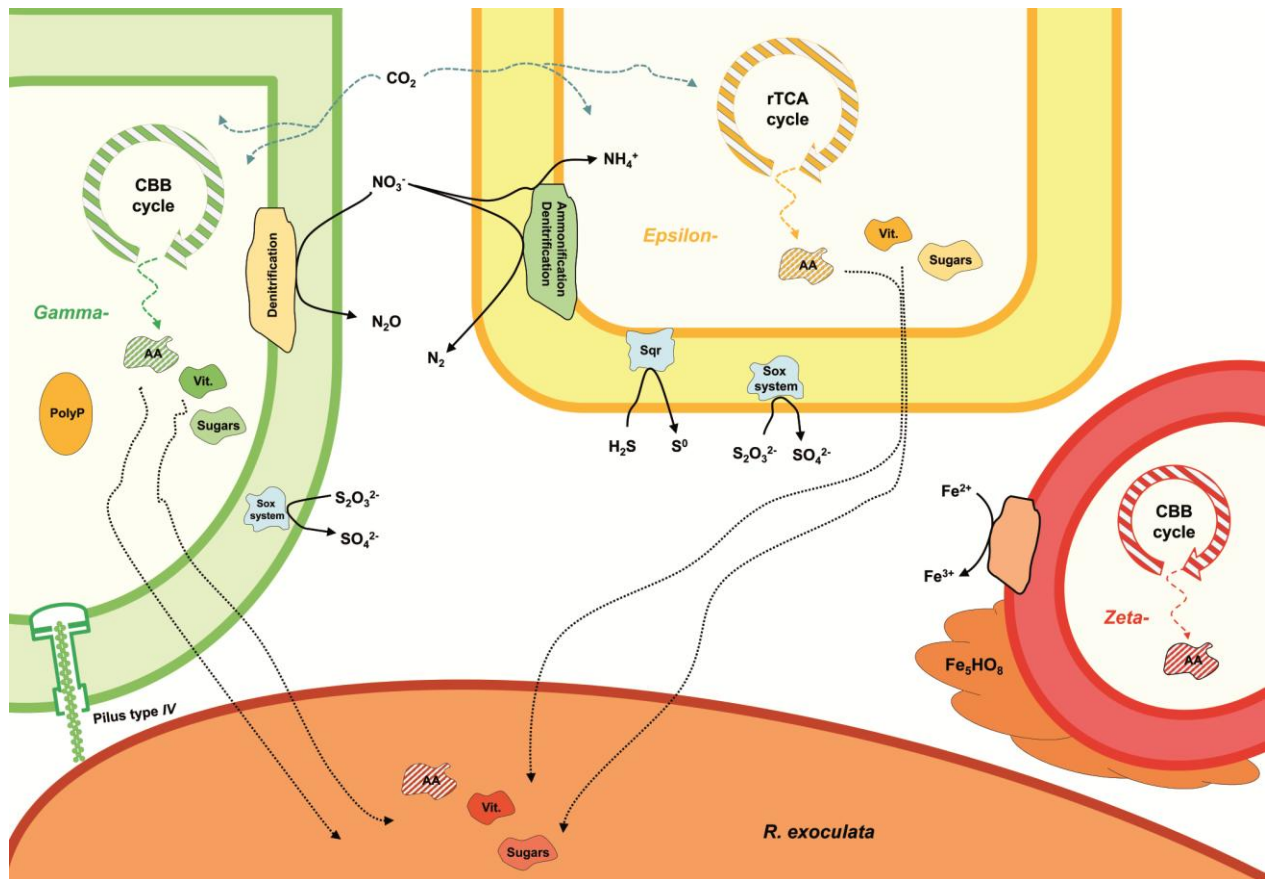


Figure 46 : Fonctionnement hypothétique de la communauté symbiotique du céphalothorax et des interactions hôtes-symbiontes (Jan et al., 2014). AA : acides aminés ; Sqr : sulfide-quinone oxydoreductase ; Vit. : vitamines ; PolyP : polyphosphates. Les flèches discontinues correspondent à une synthèse indirecte (pour les acides aminés), diffusion (pour le CO_2), ou à un transfert (acides aminés, sucres et vitamines).

Des gènes connus pour être impliqués dans les interactions hôtes-symbiontes (Quorum Sensing, attachement aux surfaces) ont également été identifiés. Cependant les mécanismes permettant aux symbiontes de coloniser de manière spécifique certaines parties du céphalothorax reste encore inconnus.

3.4. Une installation ordonnée

Comme nous l'avons vu précédemment *R. exoculata* possède un cycle de mue très court (*cf* section IV-1). A chaque mue, le tapis microbien des épibiontes, localisé sur la cuticule des pièces buccales et sur la face interne des branchiostégites, disparaît avec ces cuticules. La recolonisation du céphalothorax se fait progressivement selon différentes étapes (Figure 47) (Corbari et al., 2008b). Tout d'abord les symbiontes s'attachent à la cuticule par « îlots » (Figure 47A1). Les premiers à apparaître sont des bacilles qui se développent en formant un tapis en expansion, puis ce sont des filaments qui se développent (Figure 47B1). La proportion de ces filaments augmente ensuite au fur et à mesure que le cycle de mue de la

crevette avance, tout comme la quantité de minéraux qui s'agrègent (Figure 43C et 47E1). L'accumulation de ces particules minérales enveloppant les épibiontes va jusqu'à former une croûte épaisse donnant sa coloration à la crevette (dépôts rouge d'oxydes de fer pour le site Rainbow, dépôts noir de sulfates de fer pour les sites Logatchev, Ashadze, TAG et Snake Pit) (Figure 47E). En phase pré-ecdysiale avancée, c'est-à-dire juste avant la mue proprement dite, cette croûte est si épaisse qu'elle couvre presque totalement la longueur des épibiontes filamenteux. D'ailleurs de nombreuses figures de lyse ayant été observées parmi les épibiontes filamenteux au cours de cette phase (Durand, 2010). Ceux-ci pourraient donc être contraints, comme « étouffés » par les minéraux. La structure et l'établissement de cette communauté rappellent ceux d'un biofilm (Figure 4) (Donlan 2002 ; Stoodley et al., 2002 ; Vlamakis et al., 2013 ; Corbari et al., 2008b) qui font appel au Quorum Sensing (cf section II).

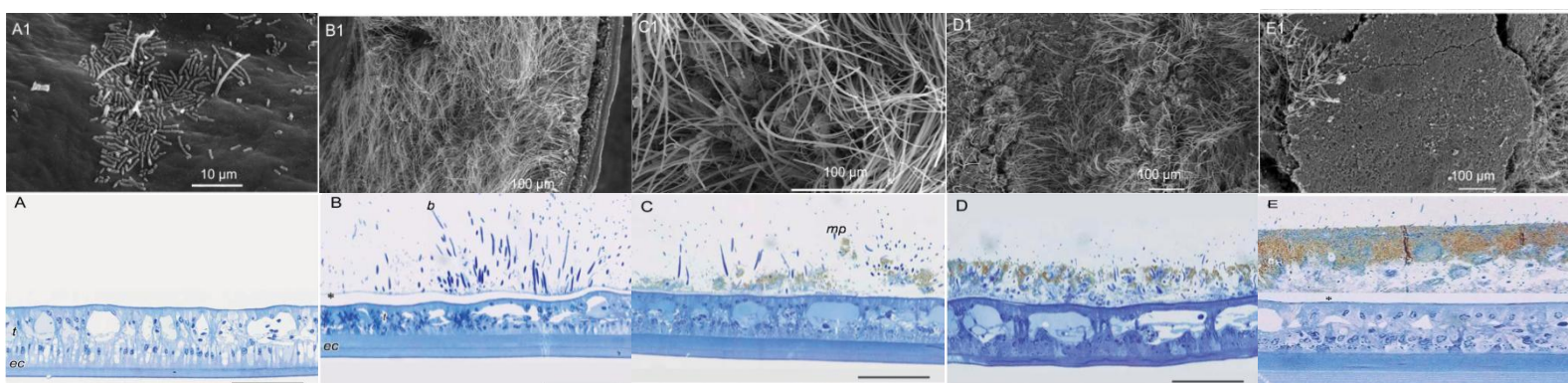


Figure 47 : Mise en place de la communauté symbiontique du céphalothorax de *R. exoculata* au cours d'un cycle de mue (Corbari et al., 2008). A1 et A : fixation des symbiontes par spot après la mue; B et B1 : formation du tapis microbien ; C1 à E1 et C à D : accroissement en épaisseur du tapis microbien accompagné d'une accumulation de minéraux jusqu'à la prochaine mue (E1 et E).

Hormis les voies métaboliques mises en évidence, des homologues de gènes de virulence chez les *Epsilonproteobacteria* ainsi que des gènes liés au Quorum Sensing ont été identifiés chez les *Epsilonproteobacteria* et *Gammaproteobacteria* lors de l'étude du métagénome (Jan et al., 2014). Parmi ces gènes du Quorum Sensing, un gène *luxS* complet a été retrouvé dans le taxobin des epsilonprotéobactéries, ainsi qu'un gène *luxR* incomplet, et un gène *luxR* complet a été identifié dans le taxobin des gammaprotéobactéries. A ce jour aucun gène *luxI* n'a pu être identifié dans ce métagénome. Ces catégories de gènes peuvent être impliquées dans les interactions hôte-symbiontes et la reconnaissance des bactéries par l'hôte. Des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'attachement aux surfaces ont

également été mis en évidence (pili de type IV, antigène O), ceux-ci reflétant la capacité de ces bactéries à former un biofilm à l'intérieur du céphalothorax de la crevette, et pouvant participer à la transition entre une vie libre et une vie fixée en biofilm.

A ce jour rien n'est connu concernant les modes de reconnaissance entre *Rimicaris exoculata* et ses deux communautés microbiennes associées, distinctes entre elles et de l'environnement. La présence des symbiontes filamenteux très localisés et non septés entre les microvillosités des cellules épithéliales saines du mésentéron, laisse supposer un contrôle de la division/prolifération cellulaire des épibiontes par l'hôte. De même, au niveau de la cavité céphalothoracique, les symbiontes sont strictement localisés sur certaines pièces buccales et ne sont jamais retrouvés au niveau des branchies, pourtant situées dans la même cavité. Enfin, la diversité retrouvée au sein de ces deux communautés symbiotiques est faible ce qui suppose, soit une sélection depuis l'environnement dans le cas d'une transmission horizontale, soit une sélection depuis une communauté initiale si les symbiontes sont transmis de manière verticale. Il existe donc probablement un mode de reconnaissance et de contrôle strict à ce niveau, permettant la recolonisation à l'identique après chaque mue.

L'objectif principal de ces travaux est de rechercher des mécanismes pouvant jouer un rôle clé dans la mise en place d'une colonisation microbienne sélectionnée et contrôlée, stable dans le temps et l'espace chez *Rimicaris exoculata*. Les travaux de cette thèse sont donc principalement concentrés sur l'étude des épibiontes associés au céphalothorax de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* au cours de son cycle de mue. Ceux-ci sont pour l'instant articulés autour de deux volets.

Le premier volet a eu pour but d'étudier les gènes du Quorum Sensing lors de la croissance de la communauté d'épibiontes du céphalothorax sur des spécimens à des stades de vie et de mue distincts. Le second volet est basé sur l'étude d'un peptide antimicrobien dont une partie du gène a été mis en évidence lors de l'étude du métagénome des épibiontes (Jan et al., 2014), dans le but de mieux comprendre l'implication du système immunitaire de l'hôte lors de l'établissement de la symbiose.



Chapitre 2

Matériel

et Méthodes



I. Campagne Océanographique

L'étude des crustacés des systèmes hydrothermaux présente certaines difficultés auxquelles il faut s'adapter. En effet les *R. exoculata* vivant au niveau de certains sites hydrothermaux actifs situés le long de la ride médio-Atlantique, leur échantillonnage implique l'utilisation de moyens lourds et le développement d'outils spécifiques, tel un navire océanographique et un sous-marin équipé d'outils de prélèvement spécialisés. La collecte de spécimens d'animaux vivants est donc délicate car elle doit être réalisée dans des conditions permettant de préserver les individus et de les récupérer rapidement après leur collecte. Pour *R. exoculata*, les individus sont récupérés à bord du navire océanographique entre deux et trois heures après leur collecte, selon la profondeur du site de prélèvement. Puis une partie des spécimens est immédiatement traitée pour diverses expérimentations en laboratoire en tant que spécimens de référence (ou témoins). L'autre partie est utilisée pour des expérimentations *in vivo* puis traitée pour des expérimentations en laboratoire à bord du navire océanographique.

1. Echantillonnage

Les crevettes *Rimicaris exoculata* à différents stades de mue ont été prélevées sur plusieurs sites hydrothermaux lors de différentes campagnes océanographiques : les sites Logatchev (14°45'N ; -3010 m) et Ashadze (13° N; -4200 m) lors de la campagne SERPENTINE en 2007, le site Rainbow (36°14'N ; -2320 m) lors des campagnes MoMARDREAM-Naut en 2007, MoMAR08 en 2008 et BioBaz en 2013, et le site TAG (26°08'N ; -3650m) et Snake Pit (26°08'N ; -3480m) lors des campagnes EXOMAR en 2005 et BICOSE en 2014 (*cf* carte chapitre 1 section III 1.1.3).

Les crevettes de cette étude ont été prélevées sur plusieurs sites hydrothermaux lors de différentes campagnes océanographiques. Elles ont été collectées à l'aide de l'aspirateur à faune (Figure 48) installé sur les submersibles ROV (Remotely Operated Vehicle) « Victor 6000 » ou le sous-marin habité « Nautilie », à bord des navires océanographiques « L'Atalante » et « Pourquoi pas ? » de l'Ifremer (Figure 49). Les crevettes sont soit remontées dans les bols de l'aspirateur fixés sur le sous-marin, soit prélevées dans la Periscopette® (Figure 48) et placées dans un caisson pressurisé PERISCOP® permettant de garder la température du fond et la pression.

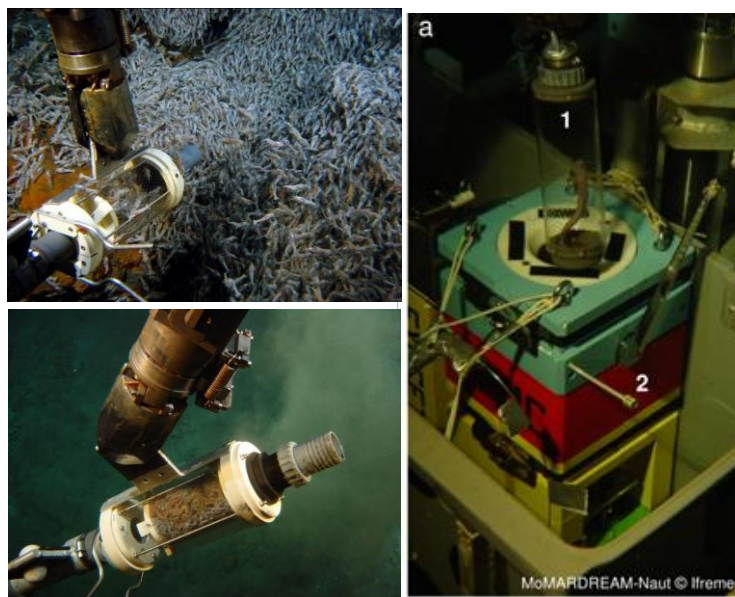


Figure 48 : Prélèvement des crevettes *Rimicaris exoculata* sur les cheminées hydrothermales avec l'aspirateur à faune et la Periscopette®. (a) a1 : la cellule de prélèvement ; a2 : le PERISCOP™.



Figure 49 : Photos en (a) du navire océanographique *Pourquoi pas ?*, en (b) du submersible non habité *Victor 6000* et en (c) du submersible habité *Nautilie*.

Les individus sont récupérés à bord du navire océanographique entre deux et trois heures après la collecte selon la profondeur du site de prélèvement. A bord, une partie des spécimens collectés (mâle, femelles, juvéniles) est congelée vivante à -80°C , d'autres sont immédiatement disséqués en conditions stériles. Les différentes pièces anatomiques prélevées

(ex. : scaphognathites, exopodites, branchiostégites, tubes digestifs, etc.) sont alors soit congelées à -80°C dans des cryotubes pour l'extraction d'ADN, soit dans du TRIzol pour l'extraction d'ARN, soit fixées pour les différentes méthodes de microscopies (dans du glutaraldéhyde à 2,5% pour la microscopie électronique, dans du formaldéhyde à 3% pour le FISH) (Durand et al., 2010). Les spécimens sont conditionnés en fonction de leur stade de mue (Corbari et al., 2008) (Figure 50). Il a été collecté des spécimens de *R. exoculata* de couleur blanche, orange et rouge sur Rainbow, blanche et noire sur Logachev, TAG et Snake Pit et uniquement noire sur Ashadze. Une autre partie des spécimens est directement conditionnée dans du dichlorométhane et conservée à -20°C pour l'étude des homosérines lactones (AHL) par spectrométrie de masse.

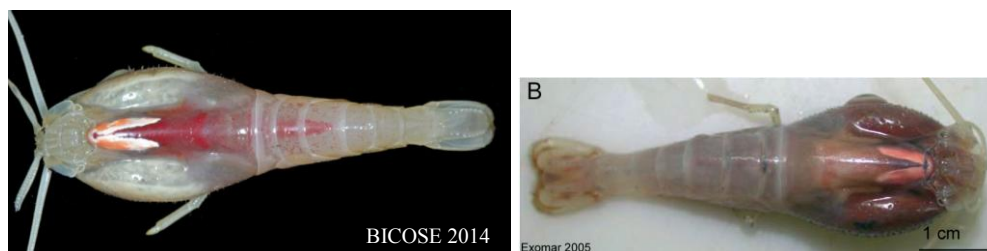


Figure 50 : Photographie de *Rimicaris exoculata* en phase post-ecdysiale (après la mue) (A) et pré-ecdysiale (avant la mue) (B)

Une partie des individus est directement utilisée à bord du navire pour des expérimentations *in vivo* en aquarium pressurisé (cf section ci-après).

2. Expériences sous pression

L'expérimentation *in vivo* sur des organismes vivants provenant des profondeurs des océans fait intervenir une difficulté majeure : recréer à la surface et conserver durant la remontée la pression hydrostatique *in situ*. En effet, les spécimens collectés subissent le phénomène de la décompression lors de leur remontée. Les arthropodes et les bivalves supportent relativement bien ces fortes variations de pressions, qui sont en revanche létales pour certains organismes comme les annélides et les poissons. En réponse à ce problème, des collaborateurs de l'Université de Paris VI ont mis au point un système permettant de maintenir la pression *in situ* pendant la remontée : le PERISCOPTM (Projet d'Enceinte de Remontée Isobare Servant à la Capture d'Organismes Profonds (Shillito et al., 2008) (Figure 51). Cette même équipe a également développé un aquarium pressurisé qui permet les expérimentations d'organismes vivants à la pression hydrostatique *in situ* du fond :

BALIST™ (Biology of Alvinella : Isobaric Sampling and Transfer) et IPOCAMP™ (Incubateur Pressurisé pour l'Observation et la Culture d'Animaux Marins Profonds (Shillito et al., 2001).

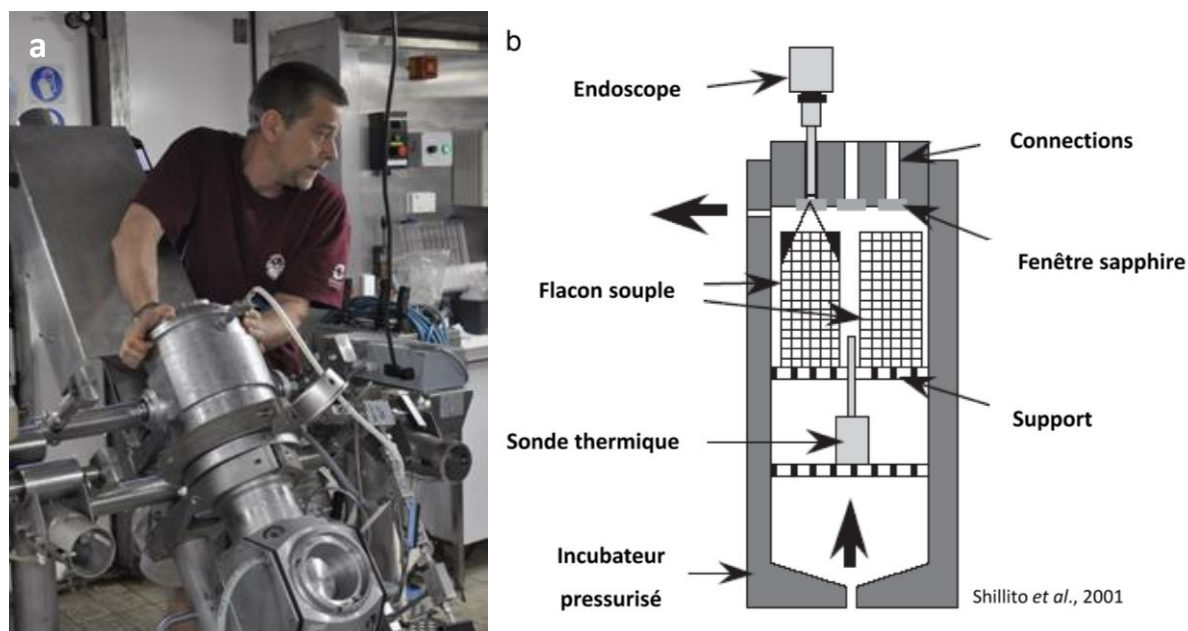


Figure 51 : Outils pour le prélèvement et d'expérimentation *in vivo* des animaux marins profonds.
(a) photo du BALIST™. (b) schéma de la structure de l'IPOCAMP™.

Grâce à ces systèmes, diverses expériences à la pression *in situ*, ont été effectuées sur *R. exoculata* pendant la campagne BioBaz en 2013 sur le site Rainbow et BICOSE en 2014 sur les sites TAG et Snake Pit.

D'une part des tests de mise en compétition des symbiontes de *Rimicaris exoculata* ont été réalisés. Pour cela 3 souches bactériennes (*Pyrococcus abyssi* GY855, *Vibrio diabolicus* HE800, *Methanococcioides vulcanii* SLH33) sont soit injectées aux animaux, soit ajoutées dans l'eau d'incubation des crevettes (Figure 52). Les crevettes sont mises à incuber sous pression *in situ* 30 MPa à 10°C pendant 6 à 8 heures. Les animaux sont ensuite conservés à -80°C et l'eau d'incubation est filtrée à 0,22µm et conservée à -20°C.

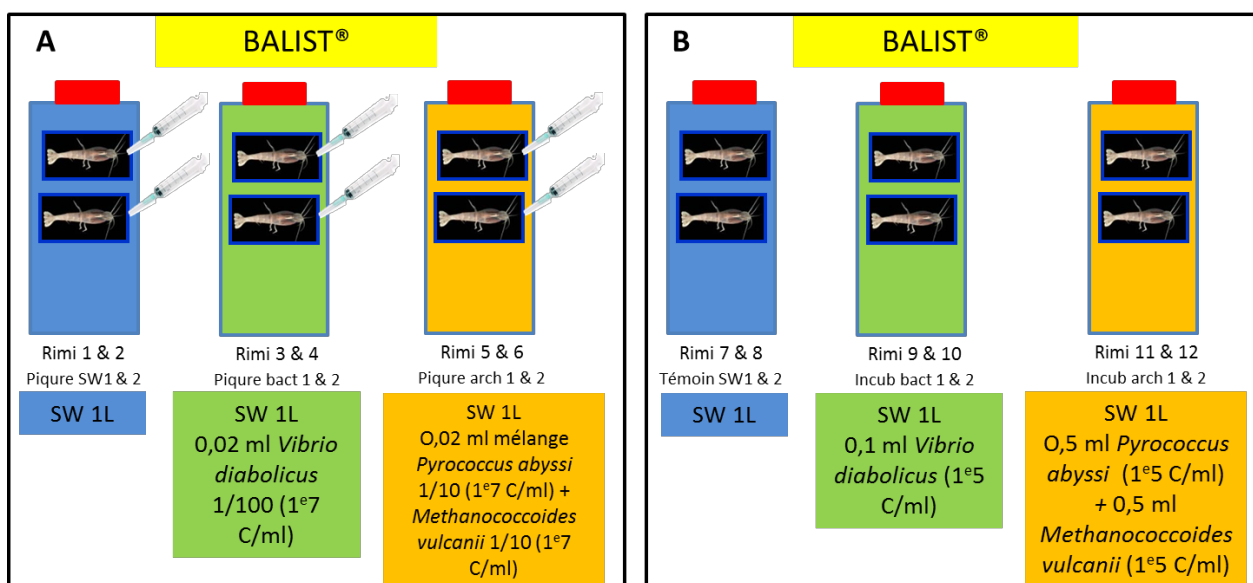


Figure 52 : Expérimentation de compétition des symbiontes de *R. exoculata* en aquarium pressurisé BALIST (Campagne BioBaz 2013 et BICOSE 2014) soit (A) par injection soit (B) par baignée de la souche bactérienne *Vibrio diabolicus* HE800 et des archae *Pyrococcus abyssi* GY855, et *Methanococcoides vulcanii* SLH33.

D'autre part des stress au cuivre (Cu) sont réalisés sur 24 crevettes divisées en 4 groupes. Le premier groupe (n = 6) appelé *in situ* (IS) est disséqué dans des conditions stériles puis immédiatement congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C . Les autres crevettes sont directement transférées dans l'aquarium pressurisé IPOCAMP™ pour une expérience d'exposition au Cu à 10°C . Une solution de cuivre est préparée en utilisant du CuSO_4 (qualité analytique, Sigma). Les crevettes (6 par condition) sont isolées dans des flacons de 3,8 L avec seulement de l'eau de mer (contrôle), $0,4 \mu\text{M}$ (groupe Cu1) et $4 \mu\text{M}$ de Cu (groupe Cu2). L'expérience est réalisée à 30 MPa et à 10°C pendant 72 h. Pour le renouvellement de l'eau de mer et de l'oxygène, l'IPOCAMP™ est dépressurisé toutes les 12 h et la viabilité des animaux est alors contrôlée. À la fin de la période d'exposition (72 h), la survie de la crevette était de 100%. Les tissus sont ensuite disséqués (branchies, hépatopancréas et muscle, sans intestin ou exosquelette) et immédiatement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C .

Enfin dans le cadre de l'étude des AHLs, des spécimens sont mis à incuber à pression *in situ* 30 MPa et à 10°C dans de l'eau de mer pendant 5h. L'eau de mer et les crevettes sont ensuite récupérées séparément, mélangées à du dichlorométhane (rapport v/2v) et conservées à -20°C .

II. Extraction et dosage des homosérines lactones (AHL)

Lors de la campagne BICOSE 2014, la présence d'AHL a été testée à bord en déposant directement sur une culture d'une souche rapportrice *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClean et al., 1997 ; Steindler et Venturi, 2007) les pièces colonisées par les symbiontes (branchiostégites ou Scaphognathite à différents stades de mue) disséquées directement après la remontée des animaux. Ces biocapteurs bactériens ne produisent pas d'AHL et contiennent une protéine fonctionnelle de la famille LuxR (récepteur des AHLs) clonée avec un promoteur cible apparenté qui régule positivement la transcription d'un gène rapporteur (ex : production de violacéine). Cependant cette technique est limitée par le fait que chaque souche ne peut détecter qu'un nombre limité d'AHL. Elle est également limitée à la durée de vie du biofilm symbiotique et à sa production d'AHL après la mort de l'hôte.

1. Extraction

Le protocole d'extraction des homosérines lactones est adapté de celui mis en place par Morin et collaborateurs (Morin et al., 2003). Les membranes internes des LB, les Sc, les exopodites (Exo) du 1^{er} maxillipède, les abdomens et tube digestif de 7 *R. exoculata* (spécimens adultes de 3 à 3,5 cm) sont disséqués et placés par type de pièce disséquée dans des tubes puis pesés. Les échantillons sont broyés au FastPrep bead beater (10 sec, puissance 4, 4°C) dans 700 µL de PBS-SW à l'aide d'une matrice de microbilles et centrifugé (2 min, 8000 g, 4°C). Pour chaque échantillon les surnageants récupérés sont ensuite réunis et centrifugés (10 min, 10000 rpm, 4°C) pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant limpide est récupéré et repris dans 20 mL de Dichlorométhane (CH₂Cl₂). Le mélange est agité par retournement pendant 3 minutes, puis les phases sont séparées par centrifugation (10 minutes, 4000 g, 4°C). La phase inférieure organique est récupérée, et une seconde extraction sur la phase aqueuse restante est alors effectuée (10 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés, agitation 3 min et centrifugation 10 minutes, 10000 rpm, 4°C). Les phases organiques récupérées sont alors réunies, déshydratées à l'aide de Sulfate de magnésium anhydre (MgSO₄), filtrées puis évaporées au rotavapor (30°C, 200-250mbar). Le culot est repris 2 fois par 0,5 mL d'acétonitrile (ACN) HPLC, filtré (filtre PTFE 0,45µm) et collecté dans un vial HPLC ambré. L'échantillon est ensuite conservé à l'abri de lumière à -20°C jusqu'à l'analyse. Celle-ci est réalisée dans un délai de 24 à 48 h après extraction.

2. Détection par spectrométrie de masse LC-MS-MS

L'analyse est réalisée par chromatographie liquide en phase inverse couplée à un spectromètre de masse à piège ionique quadripolaire (« trappe d'ions ») en ionisation par électronébulisation (ESI-MS) dans des conditions d'ions positifs (Morin et al., 2003).

Lors de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), l'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile, mélange d'eau et de méthanol) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de petites billes de silices sur lesquelles sont greffées des chaînes alkyles, permettant d'obtenir une phase stationnaire apolaire et hydrophobe (colonne HPLC C18 en phase inverse Hypersil ODS). Sur une colonne apolaire, en utilisant un mélange eau/méthanol comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élués avec une concentration élevée en méthanol alors que les composants plus hydrophiles sont élués préférentiellement avec une concentration faible en méthanol. Donc plus la taille de la molécule élue est grande, plus le temps d'élution est long. L'élution se fait selon un gradient linéaire (débit 0,4 mL/min) décrit dans le tableau 7.

Tableau 7 : Gradient d'élution

Temps (min)	Solvant A (méthanol/eau 50/50)	Solvant B (méthanol/eau 90/10)
0	100%	0%
10	100%	0%
25	0%	100%
42	0%	100%
43	100%	0%
54	100%	0%

Après chaque élution une solution de lavage est injectée afin d'éviter toute contamination de l'échantillon suivant. Des solutions de N-acyl ou oxo-acylhomosérine lactones de 1, 2 et 5 mg / ml sont utilisées en tant qu'étalons internes.

Les composés séparés en chromatographie liquide sont ensuite détectés en ionisation par électronébulisation avec un spectromètre Bruker Esquire-LC (Bruker Daltonic, Allemagne) dans des conditions d'ions positifs. La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur

masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) consiste à sélectionner un ion par une première spectrométrie de masse, à le fragmenter, puis à effectuer une deuxième spectrométrie de masse sur les fragments ainsi générés. Les spectres de masse obtenus sont analysés avec les logiciels Bruker Esquire-LC NT version 6.08 et Agilent Technologies Chem Station.

III. Approche génétique

1. Extraction du matériel génétique

L'ADN a été extrait à partir des pièces disséquées à bord du bateau et conservées à -80°C , à l'aide du kit Nucleospin Soil® (Macherey-Nagel) selon les indications du fabricant. Ce kit est en général utilisé pour l'extraction d'ADN contenu dans les sédiments, mais convient à l'extraction de l'ADN des tapis microbiens épibiontes, très chargés en minéraux et métaux. L'ADN des échantillons est libéré des cellules par une lyse mécanique (à l'aide de microbilles) conjuguée à une lyse chimique (à l'aide d'un tampon de lyse). L'ADN ainsi obtenu est alors fixé sur une colonne d'affinité afin de faciliter son lavage pour l'élimination d'éventuels inhibiteurs de PCR. Il sera ensuite élué puis conservé à -20°C . L'éluat contient donc à la fois les ADN bactériens et l'ADN de l'hôte. L'ARN des tapis microbiens épibiontes a été extrait à l'aide du kit Nucleospin® RNAII (Macherey-Nagel) dont le principe d'extraction est similaire à celui de l'ADN. L'ARN est ensuite traité à la DNase à l'aide du kit Turbo DNase (Ambion), afin d'éliminer toute trace d'ADN. Les concentrations d'ADN et d'ARN extraits ont été estimées à l'aide du ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop).

Pour l'étude du peptide antimicrobien l'extraction des ARNs est effectuée à partir des échantillons conservés dans le TRIzol® (ambion Cat.no 15596-026) (Chomczynski 1993, Hummon et al., 2007) selon les recommandations du fabricant. Les spécimens adultes sont broyés à l'aide l'Ultra-Turrax T25® (IKA) et les différentes pièces anatomiques disséquées à bord sont broyées deux fois au FastPrep-24® 5G (rotor CoolPrep) MP à 6,5m/secondes pendant 45 secondes avec une pause de 25 secondes sur glace entre chaque broyage. Les ARN extraits sont ensuite quantifiés à l'aide du Qubit™ 3.0 Fluoromètre selon la procédure indiquée par le fabricant.

2. Amplification des gènes ciblés

Des séquences correspondant au gène *luxS*, *luxR* ainsi que le début d'une séquence partielle d'un gène de peptide antimicrobien (caractérisé dans cette étude comme la *Re-crustine*) ont été mises en évidence dans le métagénome des épibiontes du céphalothorax (Jan et al., 2014). Dans le cas des gènes *lux*, des séquences disponibles dans les banques de données internationales ont été collectées et alignées avec celles du métagénome des épibiontes à l'aide de l'algorithme MAFT grace au Geneious[®] version 6.1.5. Ceci a permis de dessiner différents couples d'amorces, détaillés dans le tableau 8 afin d'amplifier ces gènes. Ensuite la spécificité des amorces a été testée par PCR sur des échantillons de *R. exoculata* et sur des souches de vibrio utilisées comme témoins négatifs. Par la suite les produits PCR obtenus ont été séquencés et comparés aux bases de données par BLAST pour les identifier. Afin de tester l'utilisation potentielle des ces gènes comme marqueur biogéographique 100 clones ont d'abord été séquencés sur des échantillons du céphalothorax pour tester les amorces. Ensuite 10 clones de chaque échantillons sur les différents sites ont été séquencés (*cf* chapitre 3).

Concernant la *Re-crustine* des amorces 5'-3' ont été dessinées à partir du début de la séquence partielle retrouvée dans le métagénome selon le même procédé que les gènes *lux*. La séquence entière du PAM a pu être ensuite obtenu par RT-PCR en utilisant les amorces nouvellements dessinées et un Oligo(dT)18 (*cf* chapitre 4). Les amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Amorces PCR utilisées dans cette étude

Désignation	Gène ciblé	Séquence 5' - 3'	Température de fusion (TM)
LuxSRexF	<i>luxS</i>	ATGCCATTATTAGATAG	44°C
LuxSRexR		TTTTTTATTNGNGAGT	40°C
LuxRRexF	<i>luxR</i>	ATGATAAACCTCGTTGCT	51°C
LuxRRexR		AGTTTTTACACAGCAATTAGAA	50°C
ReCrustinF	<i>Re-crustine</i>	GACAAACACCTCCTCCTCCA	62°C
ReCrustinR		GGCTTGGTTTTTCAGGTGTTC	60°C
CrusF1		TACCAGAAAAGGCCAGGA	60°C
CrusF2		CCCTGGAGGATCTTCCTCTTGTA	49°C
CrusR1		ACAGGAAGAATCACTGGAACAT	60°C
Oligo(dT)18		d(TTTTTTTTTTTTTTTTTT)	52°C
E8F	<i>ADNr 16S bactérien</i>	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Weisburg et al., 1991
U1492R		GTTACCTTGTTACGACTT	

Les gènes *luxS* et *luxR* ont été amplifiés à partir d'œufs, de juvénile, de branchiostegites, de scaphognathites, du tube digestif et de l'estomac de deux individus à différents stades de la mue de chaque site échantillonné (Rainbow, TAG, Snake Pit, Logatchev, Ashadze). Les mélanges réactionnels d'amplification par PCR contiennent 20 pmol de chaque amorce, 0,4 pmol de chaque désoxynucléotide triphosphate, du tampon 1X Go Taq Flexi vert (Promega), et 5U de GoTaq Flexi-polymérase (Promega). Le volume final a été ajusté à 25 µl avec de l'eau stérile. L'amplification est réalisée sur un thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) comme suit : 95°C pendant 5 min, puis 30 cycles de 95°C pendant 1 min, 42°C (*luxS*) ou 50°C (*luxR*) pendant 1,5 min en fonction de l'amorce (Tableau 7) et 72°C pendant 2 min, avec une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 min. Les produits de PCR de chaque réplicat ont été regroupés et ensuite purifiés avec le kit Gel NucleoSpin® and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Pour la séquence codant la Re-crustine les mélanges réactionnels d'amplification par PCR contiennent 10µM de chaque amorce, 10µM de chaque désoxynucléotide triphosphate, du tampon 5X Go Taq Flexi vert (Promega), et 5U de GoTaq® G2 Flexi DNA polymérase (Promega). Le volume final a été ajusté à 25 µl avec de l'eau stérile. L'amplification est effectuée de la manière suivante : 95°C pendant 3 min, puis 39 cycles de 95°C pendant 1,5 min, 52°C pendant 1,5 min et 72°C pendant 1,5 min, puis une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Les ARN totaux sont traités à la RQ1 RNase-free DNase (Promega Cat. M6101) selon le protocole décrit par le fabricant. Ce traitement comprend une étape de 30 min à 37°C permettant la dégradation des ADNs par la RQ1 DNase qui sera inactivée par l'ajout d'une solution stop et une incubation de 10 min à 65°C. La présence d'ADN résiduel est vérifiée en réalisant les PCR d'intérêt directement sur ces ARNs traités à la RQ1 DNase.

La reverse transcription est réalisée dans un volume de 20µl contenant 2µM d'ARN traité à la RQ1 DNase, 1µl d'oligo(dT)₁₈ ou 1µl d'amorces aléatoires, 9µL d'eau DEPC free RNase, 4µl de tampon 5X, 10µl de solution Riboblock RNase inhibitor (20u/µl), 2µl de dNTP 10mM, 1µl de l'enzyme RevertAid M-MuLV RT (Thermo Science). Les extraits d'ARN sont rétro-transcrits à 42°C pendant 1h suivi d'une élongation finale à 70°C 5 min. Les ADNc obtenus sont stockés à -20°C en attendant d'être amplifiés par PCR (cf ci-dessus).

Une fois les amplifications réalisées, une électrophorèse en gel d'agarose 0,8% dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH=8) additionné de BET (un intercalant des bases de l'ADN, 80 ng/ml final) est effectuée sous un voltage continu de 90V dans du tampon TAE 1X pendant 30 minutes. Les amplicons sont révélés aux UV et visualisés au Fluor-STM MultiImager (*Biorad*). La taille des fragments est déterminée par comparaison avec les bandes des marqueurs de taille Smart Ladder 10000 pb (*Eurogentec*) et Smart Ladder small fragment 1000pb (*Eurogentec*).

Les produits d'amplification sont ensuite purifiés au moyen du kit PCR Clean-up (Macherey-Nagel) pour les produits PCR bruts, ou du kit NucleoSpin Gel (Macherey-Nagel) lorsqu'une séparation des produits PCR sur gel d'agarose est nécessaire. La purification est réalisée sur colonne d'affinité. La qualité des amplicons purifiés est contrôlée sur gel par électrophorèse. Les amplicons purifiés sont alors clonés.

3. Clonage, séquençage et analyse des séquences

Le clonage permet de séparer des fragments ADN présents en mélange dans un échantillon. Ils sont insérés dans un vecteur, lui-même transfecté dans une cellule hôte. Le vecteur, et indirectement l'hôte, contiendront alors l'insert unique.

Les produits purifiés de PCR ont été clonés en utilisant le kit TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La taille des fragments insérés des clones d'*Escherichia coli* positifs a été vérifiée par criblage PCR avec les amorces M13F et M13R du vecteur. Ensuite, dix à cent clones ont été séquencés par échantillon par GATC Biotech (<https://www.gatc-biotech.com/>) selon la méthode de Sanger (Sanger et al., 1994) sur un appareil 3730xl ABI (Applied Biosystems) avec la technologie Dye Deoxy™ Terminator. Les séquences ont été importées dans le logiciel Geneious © version 6.1.5 (Biomatters, disponible sur <http://www.geneious.com/>) et alignées avec Maft (Kato et al., 2002). L'affiliation phylogénétique a ensuite été déterminée en comparant nos séquences avec celles présentes dans les bases de données internationales en utilisant l'outil BLAST (Altschul et al., 1997), par l'intermédiaire du logiciel KoriBlast © (Korilog).

Des alignements de protéines ont été effectués en utilisant la version 6.1.5. du programme Geneious ©. L'identification bioinformatique des LuxR solos a d'abord été basée sur la présence du motif C-terminal "HTH LUXR" (SMART00421) en utilisant le logiciel Smart7 (Simple Modular Outil de recherche Architecture) (Letunic et al., 2012) et le logiciel BLAST

(Altschul et al. , 1990). Les domaines protéiques ont été identifiés en utilisant le logiciel Smart7 avec une valeur p maximale de $2.54e^{-5}$ pour le motif de «HTHLUXR» (SMART00421) et $8.61e^{-10}$ pour le domaine «REC» (SM00448). Les résidus d'acides aminés au niveau des positions du motif WYDPWG dans le domaine de signal de liaison (SMD) conservés chez les récepteurs LuxR des AHL ont été comparés aux séquences des récepteurs LuxR des AHL des bases de données à l'aide du logiciel WebLogo 3.4.

4. RT-PCR quantitative relative

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR. Dans le cas de la technologie SYBR, cette molécule se fixe sur l'ADN double brin, et ne fluoresce qu'une fois fixée à l'ADN. Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine de Q-PCR. Une fois ce seuil dépassé, la quantité d'ADN est suffisante pour être détectée. Ce cycle PCR seuil est nommé "Ct" pour "Cycle Threshold". Cette valeur sera alors déterminante pour quantifier l'ADN complémentaire de façon absolue ou relative, sans effet de saturation qui lorsque les 30 cycles de la PCR sont atteints.

Lors de la quantification relative de l'expression d'un gène cible, son niveau d'expression (ARNm) sera comparé à l'expression d'un gène de référence dont le niveau d'expression ne varie pas dans l'échantillon quelles que soient les conditions testées (Brunner et al., 2004). Ces gènes contrôle sont la plupart du temps des gènes de ménage, tel que la GAPDH, qui servent au fonctionnement basique de la cellule, présent dans toutes les cellules de l'organisme et dont le niveau d'expression est relativement constant. D'après une étude précédente portant sur des stress thermiques chez *R. exoculata* (Cottin et al., 2010), le gène de la Rpl8 semble être le meilleur étalon car plus stable que la GAPDH ou le 18S.

L'amplification est réalisée à l'aide du kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD) selon les recommandations du fabricant. Les PCR en temps réel ont été réalisées sur un système CFX96 qPCR (BioRad) en utilisant un démarrage à chaud à 95°C, puis 40 cycles à 95°C, 15 secondes ; 59°C, 1 minute et 72°C, 30 secondes, et une étape d'extension finale à 72°C pendant 3 min. L'analyse des données par rapport à l'expression du gène de référence stable a été effectuée en utilisant la méthode $\Delta\Delta C_T$ (Livak et Schmittgen 2001). Pour chaque couple d'amorces, une dilution log de l'ADNc par rapport au ΔC_t a été générée pour valider les amplifications de qPCR (données non présentées). Le gène de référence et le gène cible sont amplifiés dans des puits séparés.

Tableau 9 : Amorces RT-PCR quantitative utilisées dans cette étude

Désignation	Gène ciblé	Séquence 5'- 3'	Température de fusion (TM)
Rimicaris-Crustin-F	<i>Re-crustine</i>	ACTGCTGTGAGAACGGGAAC	62°C
Rimicaris-Crustin-R		AACATGTTTGAGGGGGTCCT	60°C
Rimicaris-Rpl8-F	<i>Rpl8</i>	GAAGCTCCCATCAGGTGCCAAGAA	54°C
Rimicaris-Rpl8-R		TTGTTACCACCACCGTGAGGATGC	54°C

IV. Analyse protéique de la Re-crustine

1. Extraction et dosage des protéines

L'extraction des protéines est réalisée sur les mêmes échantillons utilisés pour l'extraction des ARNs effectuée dans le TRIzol ® (ambion Cat.no 15596-026) (Chomczynski 1993, Hummon et al., 2007) selon les recommandations du fabricant. Une fois extraites, les protéines des différents échantillons sont dosées au Bradford Reagent (SIGMA-ALDRICH, Cat.no B6916) selon les indications du fabricant. Une gamme étalon à partir de protéine standard (BSA) solubilisée dans de l'eau ultra pure, est préparée à des concentrations allant de 0,1 à 1,4 mg/ml (incrément de 0,5 mg/ml). Après 5 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 595nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les échantillons biologiques sont dosés selon les mêmes modalités à partir d'un aliquot de 5µl.

2. Western blot

a) Electrophorèse SDS-PAGE

Les protéines sont ensuite séparées selon leur masse moléculaire dans un gel de polyacrylamide. Au cours de la migration les protéines sont d'abord concentrées dans un gel de concentration (4%) puis séparées selon leur masse dans un gel de séparation (12%). Les gels de concentration (Acrylamide/Bisacrylamide 4% ; Tris-HCL 0,5M, pH 6.8 ; SDS 0,1% ; persulfate d'ammonium 0,1% ; TEMED 0,01%) et de séparation (Acrylamide/Bisacrylamide 12% ; Tris-HCL 1,5M, pH 8.8 ; SDS 0,1% ; persulfate d'ammonium 0,1% ; TEMED 0,01%) sont réalisés à partir d'Acrylamide/Bisacrylamide 40%.

La solution du gel de séparation est tout d'abord coulée entre deux plaques de verre et une couche d'eau ultra pure est ensuite déposée au-dessus de la solution d'acrylamide, afin

d'éviter les irrégularités dans le haut du gel et d'obtenir ainsi un front de migration horizontal. Après polymérisation, l'eau est enlevée et le gel de séparation est coulé comme précédemment. La migration des échantillons est effectuée dans du tampon Laemmli (Tris 125mM, pH 6.8 ; glycérol 20% ; SDS 4% ; 5% bêta-mercapto-ethanol) et du bleu de bromophénol. La migration dans le gel de séparation s'effectue à 70V 15min puis dans le gel de séparation à 180V 20 min.

b) Transfert sur membrane

Une fois la migration effectuée les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Figure 53). Le gel est déposé sur une membrane de nitrocellulose en sandwich entre deux papiers Whatman imbibés de tampon de transfert (3g de tris+14.32g de glycine+20% méthanol qsp1L). Le transfert se fait à 15V pendant 20 min à une intensité constante (0,8 mA par cm² de membrane).

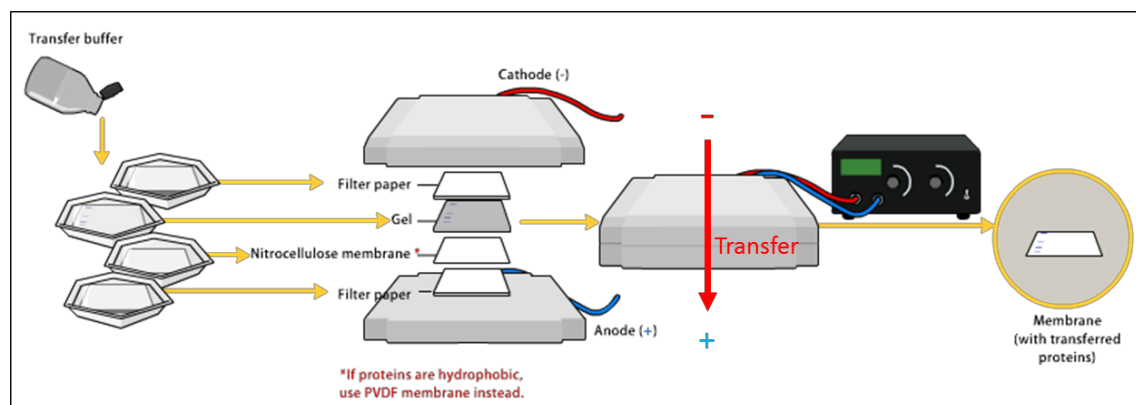


Figure 53: Western blot, transfert sur membrane (source wikipedia.org)

c) Saturation et marquage

A la fin du transfert, la membrane est saturée en protéines autres pendant 1h sous agitation avec du PBS 0.1M tween-20 0.05% contenant 5% lait (filtré). La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire anti-Re-crustine (dilution au 1: 300 dans PBS Lait 3%), puis rincée trois fois 10 min dans du PBS Tween-20 0,05%. Pour finir elle est mise à incuber 1h sous agitation avec l'anticorps secondaire HRP UP511380 dilué au 1 : 1000 dans PBS-Tween-20 0,05%, avant d'être finalement rincée trois fois 10 min dans PBS Tween-20 0,05%, puis trois fois 10 min dans du PBS 0,1M.

d) Révélation

La membrane marquée est saturée d'ECL (ECL Western blotting kit (Amersham Biosciences)), substrat luminescent, pendant 5 min puis placée dans un film plastique propre à l'abri de la lumière. Dans la salle de révélation, à l'obscurité, la membrane est mise en contact avec un film photographique Kodak X-Omat AR pendant 1min. Le film est par la suite incubé dans l'ordre dans un bac contenant une solution de décoloration jusqu'à l'apparition du marquage, puis dans un bac contenant une solution de fixation et est pour finir rincé à l'eau distillée.

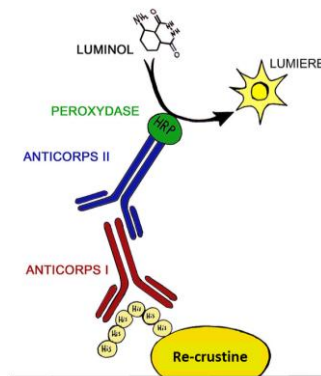


Figure 54: Western blot couplé avec ECL (source wikimedia.org)

V. Observation par hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

La préparation des échantillons pour l'observation en FISH a été réalisée d'après le protocole de Sébastien Duperron, modifié par Lucile Durand (Duperron et al., 2005, Durand et al., 2010). Brièvement, après leurs remontées les crevettes sont disséquées et les pièces anatomiques sont rapidement fixées dans un mélange d'eau de mer et de formaldéhyde 3% pendant 3h, puis conservées dans un tampon éthanol / PBS2X (Phosphate Buffered Saline) (1/1), après plusieurs rinçages dans du tampon PBS1X. Au laboratoire, les échantillons sont inclus dans une résine composée de polyéthylène glycol et d'hexadécanol (90/10). Puis, à l'aide d'un microtome, des coupes de 4 à 6 μm sont réalisées à partir des blocs d'inclusions. Ces coupes sont montées sur lame et peuvent être conservées à -20°C . Avant de réaliser l'hybridation, la résine est dissoute en plongeant les lames dans 3 bains successifs d'éthanol à 95% pendant 5 min, puis les échantillons sont partiellement réhydratés dans une solution d'éthanol à 70%. Il peut y avoir plusieurs coupes sur une même lame, chacune va être délimitée par un cercle de silicone permettant de retenir les différents tampons successifs.

L'hybridation est réalisée, après dépôt de 30 µl de tampon d'hybridation contenant une ou deux sondes (le % de formaldéhyde peut varier en fonction de(s) sonde(s) utilisée(s)) sur chaque échantillon. Les lames sont alors incubées pendant 3h à 46°C (hybridation). Ensuite, les lames sont plongées 15 min à 48°C dans une solution de rinçage puis brièvement passées dans de l'eau MilliQ. Après séchage, les lames sont montées avec un agent atténuant l'extinction de la fluorescence ou « antifading » (SlowFade® Gold, Invitrogen) contenant du 4',6' – diamidino-2-phénylindole (DAPI), puis sont conservées à -20°C. Les observations en épifluorescence sont réalisées à l'aide d'un microscope Zeiss Imager Z.2 équipé du système Colibri et de la technologie Apotome.



Chapitre 3

Mise en évidence de gènes *lux* du Quorum Sensing et de leur expression chez la communauté épibiontique de la crevette *Rimicaris exoculata*. Utilisation possible comme marqueurs de biogéographie.



1. Introduction de l'étude

La crevette *Rimicaris exoculata* colonise de nombreux sites hydrothermaux profonds de la ride médio-Atlantique (MAR) sur lesquels elle forme d'importants agrégats colonisant les parois des cheminées hydrothermales actives. Elle vit en association symbiotique avec deux communautés microbiennes distinctes qualifiées d'épibioses ou ectosymbioses. L'une est située dans l'intestin (Polz et al., 1998 ; Zbinden et Cambon-Bonavita, 2003 ; Durand et al., 2010 et 2015) et l'autre dans le céphalothorax (Van Dover et al., 1988 ; Casanova et al., 1993 ; Segonzac et al., 1993 ; Polz et Cavanaugh, 1995 ; Gebruk et al., 2000 ; Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a, 2008b ; Petersen et al., 2010 ; Hügler et al., 2011 ; Guri et al., 2012 ; Ponsard et al., 2013 ; Jan et al., 2014). La communauté microbienne du céphalothorax est éliminée à chaque mue de *R. exoculata*, tous les 10 jours (Corbari et al., 2008 ; Guri et al., 2012), mais pas celle du tractus digestif non soumise à la mue (Durand et al., 2010). Après chaque mue, les épibiontes recolonisent rapidement l'hôte pour former une nouvelle communauté. La colonisation symbiotique s'effectue selon différentes étapes toujours observées de manière identique, quel que soit l'hôte et le site étudié (Corbari et al., 2008, Corbari unpublished data). Ces étapes de colonisation rappellent celles retrouvées lors de la formation d'un biofilm (Dolan et al., 2002 ; Stoodley et al., 2002 ; Monroe et al., 2007). Les bactéries formant un biofilm peuvent utiliser un système de communication dépendant de la densité de population : le Quorum Sensing (QS) (Nealson et al., 1970 ; 2004, Bassler et al., 1994 ; Visick et al., 2006 ; Eberl et al., 2011). Dans une communauté symbiotique, ce mécanisme pourrait contribuer à la formation du biofilm attaché à l'hôte (Filloux et Vallet, 2003). En règle générale, les bactéries Gram-négatives (ce qui est le cas de la population épibiontique de *R. exoculata*) utilisent de petites molécules diffusibles, les N-acylhomosérines lactones (AHL) pour la communication. Le système typique de QS des bactéries à Gram-négatif est constitué d'un enzyme, une synthase auto inductrice LuxI, qui produit les AHL sous forme de signaux et un récepteur de type LuxR qui détecte ces AHL pour contrôler l'expression de gènes spécifiques (Waters et Bassler, 2005). Une autre classe de QS est le système hybride identifié chez la bactérie marine bioluminescente *Vibrio harveyi*, qui produit et détecte deux auto inducteurs distincts : AI-1 et AI-2 (Bassler et al., 1994). Comme dans le système de QS des bactéries à Gram négatifs, AI-1 est une AHL (Cao et al., 1989), alors qu'AI-2 de *V. harveyi* est un furanosyle borate diester synthétisé par l'enzyme LuxS (Sperandio et al. 1999; Rader et al, 2007).

Certains gènes *lux* ont été identifiés dans le métagénome partiel des épibiontes de *Rimicaris exoculata* (Jan et al., 2014). Selon les études antérieures mentionnées ci-dessus, la diversité des communautés épibiontes semble très stable dans le temps et l'espace. On peut donc supposer qu'une sélection ait lieu au cours des étapes de la colonisation, réalisée par l'hôte ou entre les épibiontes eux-mêmes. Tout ceci nous conduit à l'hypothèse selon laquelle il pourrait y avoir un système de reconnaissance et un contrôle strict permettant une recolonisation à l'identique après chaque mue, en terme de phylogénie et de distribution spatiale dans le céphalothorax. En outre, même si plusieurs résultats démontrent que les signaux du QS bactériens peuvent également être détectés par des organismes eucaryotes (Joint et al., 2002, Tait et al. 2005, Tait et Havenhand 2013), le rôle du QS dans des environnements extrêmes est encore peu étudié, en particulier dans les systèmes hydrothermaux (Montgomery et al., 2013). Actuellement, aucune donnée n'est disponible au sujet des voies de reconnaissance entre *Rimicaris exoculata* et ses deux communautés microbiennes symbiotiques (cavité céphalothoracique et système digestif) et entre les épibiontes eux-mêmes leur permettant une colonisation à l'identique, active et sans compétition-exclusion apparente. Par conséquent, cette étude a pour buts de déterminer i) si les gènes *lux* sont présents et exprimés dans chaque communauté épibiontique de *R. exoculata* sur les sites hydrothermaux de la MAR au-delà de Rainbow et ii) si ces gènes *lux* du QS pourraient être utilisés comme nouveaux outils de biogéographie.

2. Méthode expérimentale utilisée

Pour répondre à ces questions, deux approches sont mises en œuvre. La première est une approche moléculaire visant à rechercher la présence et l'activité des gènes *lux* possiblement impliqués dans le QS des communautés épibiontes du céphalothorax à différents stades de mue, et de vie (juvéniles et œufs) de *R. exoculata* provenant de quatre sites hydrothermaux de la MAR (Rainbow, TAG, Snake Pit et Logatchev). Pour cela des techniques de PCR, RT-PCR ainsi que des outils de bio-informatique ont été utilisés. La deuxième approche est biochimique. Elle a été menée afin de tenter de caractériser et quantifier les molécules de communication de type AHL par LC-MS-MS. Dans le cadre de l'étude des AHLs, des spécimens ont été mis à incuber à pression *in situ* de 30 MPa et à 10°C dans de l'eau de mer pendant 5h. L'eau de mer et les crevettes ont ensuite été récupérées séparément, mélangées à du dichlorométhane (rapport v/2v) et conservées à -20°C afin de conserver les AHLs.

3. Article :

Mise en évidence de gènes *lux* du Quorum Sensing et de leur expression chez la communauté épibiontique de la crevette *Rimicaris exoculata*. Utilisation possible comme marqueurs de biogéographie.

(En révision)

Highlighting of Quorum Sensing *lux* genes and their expression in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* ectosymbiotic community. Possible use as biogeographic markers.

Simon Le Bloa^{1,2,3}, Lucile Durand¹, Valérie Cueff- Gauchard^{1,2,3}, Josiane Le Bars^{1,2,3}, Laure Taupin⁴, Charlotte Marteau⁴, Alexis Bazire⁴, Marie-Anne Cambon-Bonavita^{1,2,3*}.

¹ Ifremer, Centre Bretagne, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, DEEP/LM2E, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, ZI Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France.

² Université de Brest, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, Technopôle Iroise, 4 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

³ CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, Technopôle Iroise, 4 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

⁴ Université de Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, Rue de Saint Maudé, 56321 Lorient, France.

*Correspondance : Marie-Anne Cambon-Bonavita, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes LM2E - UMR 6197, Ifremer Centre Bretagne, CS10070, 29280 Plouzané.

Phone : +33 2 98224756

Fax : +33 2 98224757

E-mail: macambon@ifremer.fr

Key words: symbiosis, *Rimicaris exoculata*, lux genes, hydrothermal vents, genetic marker.

Running title: lux genes in *Rimicaris exoculata* holobiont model

Abstract

Rimicaris exoculata is a caridean shrimp that dominates the fauna at several hydrothermal vent sites of the Mid-Atlantic Ridge. It has two distinct and stable microbial communities. One of these epibiontic bacterial communities is located in the shrimp gut and has a distribution and role that are poorly understood. The second colonizes its enlarged gill chamber and is involved in host nutrition. It is eliminated after each molt, and has colonization processes reminiscent of those of a biofilm. The presence and expression of genes usually involved in quorum sensing (QS) were then studied. At four sites, Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev, two *lux* genes were identified in the *R. exoculata* epibiontic community at different shrimp molt stages and life stages. RT-PCR experiments highlighted *lux* gene expression activity at TAG, Snake Pit and Rainbow vent sites. Their potential QS activity and their possible roles in epibiont colonization processes are discussed. Moreover, phylogenetic analysis has shown the presence of three clades for *luxS* (*Epsilonproteobacteria*) and four clades for *luxR* (*Gammaproteobacteria*) genes, each clade being restricted to a single site. These genes are more divergent than the *16S rRNA* one. They could therefore be used as biogeographical genetic markers.

Introduction

Deep-sea hydrothermal ecosystems of the Mid-Atlantic Ridge (MAR) are characterized by high pressure, no light and low nutrient availability. The geochemical conditions vary depending on the nature of the crust rock crossed by the hydrothermal fluids [1-2]. These ecosystems are sustained by microbial chemosynthesis instead of photosynthesis. Hydrothermal vents harbor a dense and endemic fauna which forms symbiotic associations with chemosynthetic microorganisms. This is the case of *Rimicaris exoculata* [3] (*Decapoda*:

Alvinocarididae), an endemic shrimp of the MAR. This crustacean represents the predominant macrofauna of some sites of the MAR, such as Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev. Based on COI and microsatellite analyses, a single haplotype can be identified along the MAR [4-5]. The genus is also found on the Central Indian Ridge and Mid-Cayman Spreading Centre [6-7]. It forms dense and moving aggregates, located closely along chimney walls in the gradient between hydrothermal fluids and cold oxygenated ambient seawater, in a temperature range between 3°C and 25°C [8-10]. This shrimp is neither predatory nor necrophagous and lives in symbiotic association with two distinct microbial communities in what is known as ectosymbiosis as symbionts are always retrieved outside the host cells. One symbiotic community is located in the gut [11-12], between the microvilli of the digestive cells and shows no visible septum [13-14]. Four main lineages are identified whatever the specimens studied, related to *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, Mollicutes and Deferribacteres. Yet their relative abundance per location and role are still enigmatic. The second symbiotic population is located in the gill chamber [15-28]. *R. exoculata* has an enlarged and almost closed gill chamber with hypertrophied mouthparts, which favors the colonization of the internal surfaces of the lateral carapaces (branchiostegites, Br) and of the mouthparts (scaphognathites, Sc) by bacteria [17]. According to microscopic observation, the gill chamber filamentous microbial community is dense, complex, and highly organized, [18], [20], [21]. Several bacterial groups mainly affiliated to *Epsilonproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, but also to *Zetaproteobacteria* and other groups such as Firmicutes or CFB have been identified. Briefly, considering all studied sites, about five OTUs sharing 93.5 to 97.5% similarity, are related to the *Epsilonproteobacteria* *Sulfurovum* genus, five to other *Epsilonproteobacteria* lineages, and two last ones to *Gammaproteobacteria* lineages, one sharing 98 to 99% similarity is related to *Leucothrix mucor* [21], [24] and one to methanotrophic symbionts (MOX lineage, [26]). Using cloning and FISH analyses, Petersen

and colleagues showed that one *Epsilonproteobacteria* OTU (or two for Rainbow) is clearly dominant per site, but a single OTU for *Gammaproteobacteria* (related to *L. mucor*) is retrieved as dominant whatever the site analyzed [24]. Despite a large microbial diversity in the surrounding environment [29] and a bacterial community switch occurring between the first stages and later stages of the *R. exoculata* life cycle [26], these epibionts are systematically retrieved in the gill chamber of all studied specimens all along the MAR [20-24]. In this epibiontic community, several autotrophic metabolisms co-exist [21], [28]. Briefly, using a metagenomic approach, Jan and colleagues showed that dominant *Epsilon* and *Gammaproteobacteria* lineages are able to use sulfur and hydrogen for autotrophic carbon fixation through rTCA and CBB cycles respectively. Some *Gammaproteobacteria* (called the MOX lineage) would be methanotrophic. In addition, the newly described *Zetaproteobacteria* would be able to oxidize iron for carbon fixation through CBB cycle [28]. Finally, a recent study demonstrated the trophic involvement of autotrophic gill chamber epibionts, showing transtegumental absorption of labeled microbial organic matter by the host [27]. Jan and colleagues raised the question of direct competition between co-occurring epibionts with similar processes, such as sulfur or hydrogen oxidation and carbon fixation. This would be prevented, thanks to subtle differences in the gill chamber that would provide sufficient niche differentiation for epibiont activities, allowing their stable co-occurrence [28] in time and space. Moreover, their involvement in detoxification processes was suggested because epibiont autotrophic metabolisms would have beneficial side effects chelating heavy metals, and converting hydrogen sulfides to sulfur or nitrite to dinitrogen [27-28]. All these results reinforced the idea of a complex stable symbiosis in *R. exoculata* with *Gammaproteobacteria* and *Epsilonproteobacteria* as the recurrent main lineages.

Like all arthropods, *R. exoculata* molts. The microbial community of the gill chamber is eliminated at each molt, every 10 days [22], [23], [26] but not the digestive community as

the gut is not subjected to the molt [13]. After each molt, epibionts re-colonize the host rapidly to form a new community, which develops through a series of different stages (Fig 1). First, this community attaches and grows as colonization spots showing organized single bacilli. Then these spots extend to rapidly form a dense microbial mat with long filamentous bacteria. This colonization is accompanied by accumulation of iron/sulfur oxides [22-23] until the next molt. Structure and establishment of this epibiotic community resemble those of a biofilm [30-32]. Based on substrate colonization experiments, Szafranski and colleagues suggested that these *R. exoculata* symbionts may be simple opportunists colonizing a new surface [33]. Putting aside the shrimp immune system that would probably prevent uncontrolled fouling [34], in biofilm formation whatever the surface colonized (living or not) bacteria can use a communication system dependent on their population density known as: the quorum sensing [35-41], (Fig 1). This QS enables biofilm formation including surface attachment, cellular arrangement and structural conformation. In a symbiotic community, this mechanism could help to maintain the biofilm attached to the host [42]. Using a 454 approach annotated by five individual taxonomic prediction tools [43], partial metagenomes were built and compared to databanks for taxonomic affiliation. Among these, *Epsilon* and *Gammaproteobacteria* taxobins were the most represented. One *luxS* gene and one almost complete *luxR* gene were retrieved in the *Epsilon* and *Gammaproteobacteria* taxobins respectively [28]. These could play a role in the shrimp colonization processes. QS systems can be divided into three primary classes based on autoinducer signal type and the means used for detection [38]. Typically, Gram-positive bacteria use peptide derivatives for communication, whereas Gram-negative bacteria use small diffusible molecules, *e.g.* *N*-acylhomoserine lactones (AHLs). However, Biswa and colleagues recently discovered the production of AHLs by a Gram-positive bacterium belonging to the *Exiguobacterium* genus, isolated from marine water [44]. The typical QS system of Gram-negative bacteria consists of

a LuxI-like autoinducer synthase that produces constantly AHLs as signals. A LuxR-type receptor detects the AHLs when they exceed a threshold concentration controlling expression of specific genes [45]. Unfortunately, no *luxI* gene has ever been identified in our partial metagenomes [28]. A last class of QS system is a hybrid between the canonical Gram-negative and Gram-positive systems. This hybrid system was initially identified in the bioluminescent marine bacterium *Vibrio harveyi*, which produces and detects two distinct autoinducers, AI-1 and AI-2 [36]. In a similar way to other Gram-negative systems, AI-1 is an AHL [46], whereas AI-2 of *V. harveyi* is a furanosyl borate diester synthesized by the LuxS enzyme [47-48], with no resemblance to other autoinducers [49]. AI-2 is an interspecies communication molecule among bacteria [37] but has yet to be observed as an interkingdom one.

Fig 1. Acquisition of symbionts in the gill chamber of *Rimicaris exoculata*.

(A) Epibiontic colonization through the molt cycle [22-23] compared to (B) biofilm formation [32].

The process of colonization is strictly similar among all individuals and molts stages analyzed [22-23] reminiscent of a biofilm formation (Fig 1). Only two complete genes of QS (*luxS* and *luxR*) were revealed in the metagenome of the epibionts from Rainbow [28]. All this leads to the hypothesis that there could be a communication system and a strict control that allow an almost identical recolonization after each molt in terms of phylogeny and spatial distribution in the gill chamber. Moreover, even if several results demonstrate that bacterial AHL QS signals can also be sensed by eukaryotic organisms [50-52], the role of the QS in extreme environments has yet to be investigated in detail, particularly for hydrothermal vents [53]. Currently, nothing is known regarding the recognition pathways between *Rimicaris*

exoculata and its two symbiotic microbial communities (gill chamber and digestive system) and between epibionts themselves. Therefore, this study was dedicated to analyzing i) whether *lux* genes are retrieved and expressed in each *Rimicaris exoculata* epibiont community collected from four MAR sites and ii) whether the *lux* genes could be used as new biogeographic tools. To address these questions, the present study uses molecular approaches to explore *lux* genes from the gill chamber epibiont communities at distinct molt stages, guts and eggs from four vent sites from north to south: Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev.

Materials and Methods

Shrimp collection, DNA and RNA extraction

Rimicaris exoculata were collected from four vent fields along the MAR using the Ifremer research vessel R/V *Pourquoi pas?* Different oceanographic cruises visited the different hydrothermal sites: SERPENTINE2007 sampled at Logatchev (14°45' N;-3010 m), BioBaz2013 at Rainbow (36°14' N;-2320 m), and BICOSE2014 <http://dx.doi.org/10.17600/14000100> at TAG (26°08' N;-3640m) and Snake Pit (23°23' N;-3480m). The slurp gun of the remotely operated vehicle (ROV) Victor 6000 was used to collect the specimens. No specific permissions were required to collect these samples in international deep seawaters. The study did not involve endangered or protected species.

Once aboard, eight living juveniles and ten living *R. exoculata* specimens at different molt stages were immediately frozen at -80°C (to be dissected later at the laboratory) or dissected on board when possible to separate the mouthparts (scaphognathite) from the inner face of the gill chamber (branchiostegite), and to sample the stomach, the gut and the eggs if present. Then each part was frozen at -80°C. At the laboratory, these parts were used to extract DNA using the NucleoSpin Soil ® (Macherey-Nagel) kit according to manufacturer's

recommendations. The quality and size of the extracted DNA was assessed by 0.8% agarose gel electrophoresis. RNA was extracted with the NucleoSpin® RNAII (Macherey-Nagel) kit and then treated using the Turbo DNASE kit (Ambion) to eliminate any traces of DNA. The concentration of DNA and of extracted RNA was estimated using an ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop) or the Qubit® RNA HS kit using the Qubit® 3.0 Fluorometer.

Amplification of lux genes

Sequences corresponding to genes *luxS* and *luxR* were revealed in the metagenome of the ectosymbionts of the gill chamber [28], yet no primer was available in the literature. The two metagenome complete *lux* sequences were therefore used with BLAST to retrieve related *luxS* or *luxR* sequences available in the international data banks. Then, one alignment per gene was done using MAFT [54] with Geneious® version 6.1.5 software. This made it possible to design new primers to try to amplify the two *lux* genes identified in the gill chamber epibiont metagenome (Table 1). The *luxS* and *luxR* genes were amplified from branchiostegites, scaphognathites, gut and stomach of two individuals at different molt stages from each sampled site and from eggs and juveniles (Table2).

Table 1. Primers used (all sequences were designed during the study).

Gene	Name	Taxon targeted	Primer sequence	Amplicons size	Melting temperature
<i>luxS</i>	LuxS RexF	<i>Epsilonproteobacteria</i>	5'ATGCCATTATTAGATA3'	550 pb	44°C
	LuxS RexR		5'TTTTTTATTNGNGAGT3'		40°C
<i>luxR</i>	LuxR RexF	<i>Gamma proteobacteria</i>	5'ATGATAAACCTCGTTGCT3'	560 pb	51°C
	LuxR RexR		5'AGTTTTTACACAGCAATTAGAA3'		52°C

Table 2. *Rimicaris exoculata* samples used for amplification of *lux* genes: (A) parts sampled from different vent sites (B) samples according to the molt stages.

A.

Samples		Vent sites			
		Rainbow	TAG	Snake Pit	Logatchev
<i>R. exoculata</i> adults	branchiostegite	✓	✓	✓	✓
	scaphognathite	✓	✓	✓	✓
	gut	✓	✓	✓	✓
	stomach	✓	✓	✓	✓
juvenile		⊙	✓	✓	⊙
eggs		⊙	✓	✓	✓

Samples available (✓) or not (⊙) for this study.

B.

Samples		Vent sites			
		Rainbow	TAG	Snake Pit	Logatchev
<i>R. exoculata</i> adults		beginning, middle and end of molt cycle	beginning and end of molt cycle		

For each site and each stage of molt or age, two specimens were analyzed. Reaction mixtures for PCR amplification contained 100 ng template DNA, 20 pmol of each primer, 0.4 μmol of each deoxynucleotide triphosphate, 1X Go Taq Flexi green buffer (Promega), and 5U GoTaq Flexi polymerase (Promega). The final volume was adjusted to 25 μl with sterile water. The PCR program involved an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 42°C or 50°C for 1.5 min according to the primer (Table 1), and 72°C for 2 min, with a final elongation step at 72°C for 10 min. After gel verification, PCR products from each replicate were pooled and then purified with the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). The size of fragments was determined using Smart Ladder markers of 10,000 bp and 1000 bp (Eurogentec). The amplification by RT-PCR was done with the OneStep kit (Qiagen). DNA presence was first tested for by PCR amplification on RNA extracts and gave no amplification. RNA extracts were normalized at 2μg/μL. Then

1 µL of RNA was used in 50µL mix to be retro-transcribed (30 min at 50°C) and amplified according to the following conditions: polymerase activation 15 min at 95°C; 40 cycles of 95°C for 1 min, 42°C or 50°C for 1.5 min, 72°C for 1.5 min, and a final elongation step at 72°C for 8 min. Scaphognathite RNA, extracted from a shrimp at the end of a molt cycle, was used as a positive control for amplification using 16S rDNA gene primers (E8F/U1492R (respectively 50-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-30 and 50-GTTACCTTGTTACGACTT-30, 1484 bp, annealing temperature 49°C,- [55].

Cloning of *lux* genes and phylogenetic analysis

For gill chamber samples, purified PCR products were used for direct sequencing to confirm primer efficiency and specificity. All samples were also cloned using the TOPO-TA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The insert size of positive *Escherichia coli* colonies was tested for by PCR screening with vector primers M13F and M13R. Then, several clones (Table 3) were sequenced by GATC Biotech (<https://www.gatc-biotech.com/>) according to the Sanger method [56] on a 3730xl ABI (Applied Biosystems) with Dye Deoxy™ Terminator technology. Related sequences were then retrieved by comparing our sequences with those present in international databases using the BLAST tool [57], via the KoriBlast © software (Korilog). Sequences were imported into Geneious® version 6.1.5 software (Biomatters, available from (<http://www.geneious.com/>) and aligned with MAFT [54].

Table 3. Clone library for the *lux* genes of *Rimicaris exoculata* epibionts.

Samples	Rainbow		TAG		Snake Pit		Logatchev	
	<i>luxS</i>	<i>luxR</i>	<i>luxS</i>	<i>luxR</i>	<i>luxS</i>	<i>luxR</i>	<i>luxS</i>	<i>luxR</i>
Gill chamber (all):	105	154	86	91	107	88		77
<i>beginning of molt</i>	21	50	34	35	25	26	0	20
<i>middle of molt</i>	10	10	0	0	0	0		0
<i>end of molt</i>	74	104	52	56	82	62		57
Digestive tract (gut and stomach)	20	20	20	20	20	20	0	20
eggs	0	10	0	10	0	10	0	48
juveniles	0	10	0	10	0	10	0	0
Male (gill chamber and digestive tract)	0	0	20	30	0	0	0	0
Total	125	194	126	161	127	128	0	145
Total per site	319		287		255		145	

Bioinformatic studies

Protein alignments were performed using the Geneious[®] version 6.1.5 program. The bioinformatic identification of LuxR solos were first based on the presence of the C-terminal “HTHLUXR” motif (SMART00421) using SMART7 software (Simple Modular Architecture Research Tool) [58] and BLAST software [59]. Protein domains were identified using SMART7 software and were identified with a maximal *p*-value of 2.54e^{-5} for the “HTHLUXR” motif (SMART00421) and of 8.61e^{-10} for the “REC” domain (SM00448). In the next step, the amino acid residues at the WYDPWG-motif positions in the signal-binding domain (SBD) of AHL-sensors were added as metadata layers.

Sequences are available at the EMBL under the number LT220912 to LT220957.

Results and Discussion

Lux gene detection in the epibiont community

To detect the presence of *luxS* and *luxR* genes in the epibiont community according to metagenome data, PCR amplifications were done on DNA extracted from branchiostegites (Br), mouthparts (scaphognathites and exopodites (Sc)) and guts of shrimps from different vent sites (Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev) at two or three molt stages (beginning, intermediate and end stages of the molt cycle) and on juveniles and eggs (Table 2, Figs 2 and 3). Both *luxS* and *luxR* have been correctly amplified, *luxR* always showed a better amplification.

Fig. 2. Example of PCR on gill chamber epibionts of *R. exoculata*.

(A) *luxS* amplification. *luxS* genes from *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* were used as negative controls. (B) *luxR* amplification on branchiostegite (br) and scaphognathite (sc) epibionts. (C) *luxR* amplification on gut (g) and stomach (st) epibionts.

Fig. 3. *lux* gene PCRs on epibionts of *R. exoculata* juveniles and eggs.

(A) *luxS* amplification on scaphognathite and eggs. (B) *luxR* amplification on scaphognathite and eggs. (C) *luxR* amplification on (br) branchiostegite and (sc) scaphognathite at the beginning (1) and end (2) of the molt.

We tested our *LuxS* primers on *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* to test their specificity. Several PCR products were obtained, but did not give the expected size. They were sequenced but were not affiliated to *luxS* genes (data not shown).

For the gill chamber epibionts (Br and Sc), the *luxS* genes were only amplified for adults from the Rainbow, TAG and Snake Pit sites (Table 4) showing better amplification

levels at the end of the molt cycle (Fig 2). Direct sequencing on PCR products gave a single sequence related to *Sulfurovum* sp., (BLAST similarity levels of 75% for *luxS* nucleotide sequence), the closest related epsilonproteobacterial symbiont genus (92% for 16S rDNA gene *Sulfovorum* NBC37-1) [24]. Only non-specific amplicons were obtained for the sample from Logatchev, the oldest samples in our study (2007). This could be due to signal extinction caused by slightly lower DNA quality. This could also be due to unspecific amplifications. The sequencing of these cloned fragments confirmed the absence of any *luxS* gene amplification (data not shown). Although this could suggest that no *luxS* gene is present in the epibiont community of the gill chamber at this site, this seems unlikely as the epsilonproteobacterial symbiont diversity along the MAR always mainly cluster within *Sulfurovum* sp. group [24].

Inversely, the *luxR* gene was well amplified for all adult gill chamber samples whatever the vent site, including Logatchev (Table 4). PCR products were either directly sequenced or cloned and always gave a single sequence per site and per sample. The closest relative was a *Gammaproteobacteria*, *Osedax* symbiont and *Oleispirra* strain RB8 sp. sharing 80% and 77% similarity respectively for *luxR* nucleotide sequence, and 85% and 83% respectively for 16S rDNA gene using BLAST.

Table 4. PCR and RT-PCR (end of molt) amplification results per sample of different *Rimicaris exoculata* parts from different vent sites for the (A) *luxS* and (B) *luxR* gene analysis.

A.

		Vent sites			
Samples		Rainbow	TAG	Snake Pit	Logatchev
<i>R. exoculata</i> adults	branchiostegite	✓	✓	✓	×
	scaphognathite	✓	✓	✓	×
	gut	×	×	×	×
	stomach	×	×	×	×
juvenile		⊙	×	×	⊙
eggs		⊙	×	×	×

B.

		Vent sites			
Samples		Rainbow	TAG	Snake Pit	Logatchev
<i>R. exoculata</i> adults	branchiostegite	✓	✓	✓	✓
	scaphognathite	✓	✓	✓	✓
	gut	✓	✓	✓	✓
	stomach	✓	✓	✓	✓
juvenile		⊙	✓	✓	⊙
eggs		⊙	✓	✓	✓

Positive PCR or RT-PCR are indicated by a (✓) and a negative PCR or RT-PCR are indicated by a (×). Samples denoted (⊙) were not available.

DNA from eggs and juveniles gave no amplification for the *Epsilonproteobacteria* epibiont *luxS* gene, whereas it was amplified for the gill chamber epibionts of related adults. Inversely, the *Gammaproteobacteria luxR* gene gave good amplifications for all these samples. Surprisingly, for the egg samples, the main amplified product was sequenced but did not match any *luxR* gene and was unaffiliated in any database (data not shown). The faint band at the expected size was sequenced and revealed a *luxR* gene sequence. Regarding the first life stages, our results are in good agreement with previous studies using cloned sequences and FISH analyses of *R. exoculata* egg and juvenile epibionts [26]. Even though the same epibiont lineages are found throughout the shrimp life cycle, a switch between the

main bacterial communities is observed. The first stages are dominated by the *Gammaproteobacteria*, and the later ones by the *Epsilonproteobacteria*. This may explain why *luxR* (*Gammaproteobacteria*) is sufficiently amplified, but not the *luxS* (*Epsilonproteobacteria*) during the first stages life of *R. exoculata*: the latter would be present in too low quantity.

Finally, DNA from the gut gave no amplification for the *luxS* gene. The epibiont community of the gut is mainly composed of lineages affiliated to *Deferribacteres*, *Mollicutes*, *Gammaproteobacteria* and *Epsilonproteobacteria*, but their relative abundance is still unknown [13-14]. These *Epsilonproteobacteria* are closely related to the gill chamber epibionts (99-100 % of similarity for the *16S* rRNA gene) and so *luxS* would have been expected to be amplified using the same primers. DNA extracted from the gut is usually in low quantities and moreover, contains many host DNAs [13]. Here, DNA extractions lead to concentrations around 2.5 to 3.5 ng/μL. Moreover, inhibitors can be present (mainly minerals and organic matter), rendering it more difficult to amplify, even using *16S* primers [13]. Inhibition controls were performed by adding gut extracted DNA to a positive control DNA template. As PCR were still positive, the inhibition test was then negative. As shown by our amplification results (Fig 2A and 2B), *luxS* genes always gave faint amplifications. This inherent difficulty of amplification, together with the low level and quality of extracted DNA could have impaired the amplification of the specific *luxS* genes. In the gut, the *luxR* amplifications gave good results for all samples tested and all sequences were grouped per site within the gill chamber clusters (Fig 6). As our *luxR* primers are specific to *Gammaproteobacteria*, this result could also suggest that they are more represented in the gut than *Epsilonproteobacteria*, for which our *luxS* primers are specific, as is the case for the first stages of life.

QS and epibiont colonization

The *luxS* and *luxR* transcripts were amplified by RT-PCR on all parts that were positively amplified in PCR (Table 4 and Fig 4). Despite the various dilutions of Br and Sc extracted RNA tried, no amplification was ever obtained for the Logatchev site samples, maybe because they were too old (SERPENTINE2007). For Rainbow, TAG and Snake Pit sites, RT-PCR amplicons were mostly obtained for shrimps at the end of the molt cycle. The sequencing of these fragments confirmed that it was the same *luxS* and *luxR* genes as those revealed by PCR for *Epsilon* and *Gammaproteobacteria*, respectively. However, it is surprising that the *luxS/luxR* expression was only detected only for the late molting stages. Indeed, QS systems appear to be involved in all phases of biofilm formation [60-61]. Our results could be explained by i) a denser epibiont community in the second part of the molt cycle that provided a greater quantity of extracted RNA, and/or ii) that QS expression occurs mostly when symbionts have almost completely colonized the gill chamber and start to regulate themselves to avoid invasion or competition. In model biofilm-forming bacteria, QS also contributes to the dispersal of biofilms [62]. QS could therefore be used here by symbionts just before the molt event to liberate some epibionts from the biofilm to prepare the new re-colonization afterwards.

Fig 4. Example of *lux* RT-PCR on gill chamber epibionts of *R. exoculata*.

Free RNase/DNase water was used as template for the negative control. (A) *luxS* amplifications were done on branchiostegite (br), scaphognathite (sc), and gut (g) shrimp epibionts at the end of molt cycle from Rainbow. A1 end of molt and A2 beginning of molt cycle (B) *luxR* amplification were done on branchiostegite (br), scaphognathite (sc), gut (g), eggs and juvenile (juv) epibionts at the beginning (B2) and at the end (B1) of the molt cycle.

The dotted box indicates the correct PCR products size. B2 was more contrasted to try to observe any amplification.

In silico, the LuxS and LuxR protein sequence alignments show functional proteins with conserved domains essential for enzyme activities (see supporting information). The *luxS* gene transcripts were correctly amplified (RT-PCR) and the LuxS protein sequence is conserved and seems to be able to produce AI-2, still not identified in our study while shown to be stable over wide chemical ranges [63-64]. LuxS could therefore be involved in communication for our model.

No *luxI* has yet been found in the epibiont metagenome [28], and no AHLs could be detected in our study (see supporting information and S3 Fig). It is then possible that LuxR proteins retrieved in our study would be LuxR solos (S2 Fig) [65-67]. LuxR solos form a protein family highly similar to QS LuxRs, which does not possess an associated cognate LuxI protein. As the signal molecule capable of being perceived by the majority of LuxR solos is still unknown, they are potential candidates for the capture of a large number of bacterial or even eukaryote signaling molecules. In this way, they could be involved in interkingdom communications [68]. So the *luxR* gene expression detected here could synthesize LuxR homologs that could respond to exogenously produced AHLs made by other bacteria of the epibiont community or by compounds produced by the shrimp during colonization [50], [52], [69], [70]. These LuxR solos could therefore be part of another type of QS system. The, *lux* gene expression by the two main epibionts of the gill chamber observed on several vent sites and their conserved protein structure therefore suggest a potential *in situ* activity of QS implied in biofilm formation.

Phylogenetic analysis: *luxS* and *luxR* as possible biogeographical markers

Functional genes, such as *pmoA* and *APS* can be used in phylogeny [21] and are usually more divergent than the 16S rDNA gene. Here our *lux* genes were proven to be transcribed and thus not to be pseudo genes subject to random mutation events. To determine whether the *luxS* and *luxR* genes could be used as biogeographical markers, 77 to 154 clones were sequenced from colonized gill chamber parts of *R. exoculata* at each vent site (Table 3). The sequences similarity level was 99.5% for the *luxS* gene and 99.8% for the *luxR* gene within each of the hydrothermal vent sites (Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev). Conversely, sequence similarity level varied from 87.3% to 91.3% for the *luxS* gene and from 95.4% to 96.6% for the *luxR* gene between the different hydrothermal vent sites. Therefore, the *lux* genes sequence inter-site diversity was much greater than the intra-site diversity, clearly separating each site of origin. These *lux* genes were then used on all other samples (state of molt, juveniles, eggs, males, females, gut) to study the biogeography of epibionts from *R. exoculata*. All sequences clustered as a single clade per site, which was not the case with the 16S rRNA genes where Rainbow was split into two clades and TAG and Snake Pit were not clearly differentiated [24], [26]. So, these *lux* genes appear to be good biogeographical markers of the different studied sites.

The phylogenetic trees of the *luxS* and *luxR* gene sequences are presented in Figs. 5 and 6. Nucleotide sequences of the *luxS* gene revealed the presence of three distinct clades according to the three vent site origins (Rainbow, TAG and Snake Pit). All the *luxS* gene sequences (378 cloned sequences, Table 3) were affiliated to the *Epsilonproteobacteria* *Sulfurovum* sp. NBC37-1 (86 % similarity), the closest symbiont lineage relative (Fig 5). Nucleotide sequence analysis of the *luxR* gene revealed the presence of four distinct clades, each associated with a single vent site. All the *luxR* gene sequences (608 cloned sequences) were affiliated to *Gammaproteobacteria* (77 % to 80% similarity) (Fig 6). According to the

phylogenetic analysis, the *luxS* gene from the *Epsilonproteobacteria* epibiont is more divergent than the *luxR* gene from *Gammaproteobacteria*, and even still more divergent than the *16S* [24], [26]. *LuxS* is not amplified for Logatchev adults, which may be due to the gene divergence impairing primer hybridization. Regarding *luxR*, all samples including eggs and juveniles were successfully amplified. It should be noted that eggs and juveniles have the same *luxR* sequence as adults collected at the same site. This indicates that recently recruited juveniles had either, i) hatched at the same location where they had been sampled (no dispersal event) or ii) acquired the hydrothermal vent selected epibiotic microbial community after a molt event that followed recruitment.

Fig 5. *luxS* gene phylogeny (calculated on 550 bp) of symbionts associated with the gill chamber of *R. exoculata*.

The robustness was tested using 500 bootstraps resampling the tree using the Neighbor-Joining algorithm with the Kimura two-parameter correction matrix. (A) *luxS* gene affiliated to *Proteobacteria*. (B) *luxS* gene affiliated to *Epsilonproteobacteria*. (C) Localizations of *R. exoculata* on hydrothermal vents and studied areas; red: Rainbow, green: TAG, blue: Snake Pit, orange: Logatchev (modified from [71]). Clone numbers are indicated between brackets.

Fig 6. *luxR* gene phylogeny (calculated on 560 bp) of symbionts associated with the shrimp *R. exoculata*.

The robustness was tested using 500 bootstraps resampling the tree using the Neighbor-Joining algorithm with the Kimura two-parameter correction matrix. (A) *luxR* affiliated to *Proteobacteria*. (B) *luxR* affiliated to *Gammaproteobacteria*. (C) Localizations of *R. exoculata* on hydrothermal vents and studied areas; red: Rainbow, green: TAG, blue: Snake Pit, orange: Logatchev (modified from [71]). Clone numbers are indicated between brackets.

Until now, based on *16S* rDNA analyses, gill chamber symbiont transmission at each molt cycle has been supposed to take a horizontal pathway [24]. According to the host genetic markers [4-5], only one host haplotype can be identified along the MAR, suggesting a single host population. The gut microbial community *16S* rDNA diversity is always restricted to four lineages: *Gammaproteobacteria* (one OTU related to *Leucothrix mucor*), *Epsilonproteobacteria* (clusters *epsiA* and *epsiB* related to *Sulfovorum* sp.), Mollicutes (groups A, B, C and D) and Deferribacteres (single OTU) [14]. According to the gut symbiont *16S* rRNA sequence analyses for these four gut lineages, segregations start to appear among sites from north (Rainbow) to south (Logatchev), mostly for the *Gammaproteobacteria* and *Epsilonproteobacteria*, which are supposedly ingested by the shrimp [13-14]. Until now, however, *16S* rDNA approaches have led to partial conclusions, as these sequences are insufficiently divergent and did not show a complete segregation between sites [14], [24].

Here, using the *lux* gene analyses, we observed clear patterns of distribution consistent with geographical patterns. Our results suggest that geographical isolation must be considered as a factor acting upon *lux* genetic variations within and among *R. exoculata* epibiont populations. So, clades observed here for each *lux* gene could be considered as geotypes [72-73], having the best fitness with regards to the constraints of the geochemical sites. Two hypotheses can therefore be proposed to explain this microdiversity among the *lux* genes that seems to be linked to the site of shrimp origin. The first hypothesis would be that the populations of symbionts are genetically isolated because of gene flux barriers between distantly related hydrothermal sites. In this model, events of dispersion would be rare or absent and the gene fluxes within the symbiotic community on a particular site would be greater than inter-site fluxes responsible for the mixing of communities. If this is the case, then symbiont microdiversity reflects the diversity of the local microbial community [24],

adapted to its local environment. It has also been shown that biogeography plays a major role in the structuring of other symbiotic bacterial populations in the northern MAR hydrothermal sites [74]. A second hypothesis postulates that the populations of symbionts are not completely spatially structured along the MAR, so all symbionts would be found everywhere [24]. For example, free-living symbiotic forms at the Rainbow site would also be present at the TAG site and *vice versa*. Under this hypothesis, the structuring of the symbiotic populations of each site would be due to the colonization of the hosts by their selected symbionts issued from a free-living pool after recruitment. This model therefore implies the existence of highly specific mechanisms of communication and recognition between the hosts and their symbionts among all those present, symbionts that would be selected for their fitness. Moreover, a recent study on the *luxS* gene among *Epsilonproteobacteria* in a deep-sea vent [63], showed that bacteria inhabiting similar ecological niches, regardless of their taxonomic distance, show closely related forms of the *luxS* gene. This would be observed because habitat and ecological niche play an important role in population selection, based on the ability to communicate. Interspecies QS within the same habitat and niche would therefore be an important driver of *luxS* evolution. To go further, more locations need to be visited and more samplings of free larvae would need to be made to draw clear conclusion about epibiont recruitment.

Our sequences were clearly clustered as a single clade per site. This could be linked to different factors: the geochemistry of the site (*i.e.* basaltic vs ultramaphic), the depth, and the geographical location (from north to south) [1], [75]. However, Petersen and colleagues showed that, despite a predominance of bacteria affiliated to a single *Epsilonproteobacteria* lineage, whatever the hydrothermal site considered, microdiversity was observed according to site of origin and, probably, geochemistry [24]. In our study, *luxS* genes showed a proximity between the two basaltic sites relative to the ultramaphic Rainbow (Fig 5), while *luxR* genes

(Fig 6) clustered Logatchev with Snake Pit (*i.e.* geographical) rather than with Rainbow (*i.e.* geochemistry of ultramafic sites). Drawing clear conclusions about the relative effects of chemistry vs geography would require samples from a greater number of vent locations showing contrasting geochemical conditions.

Concluding remarks

The presence of the *lux* genes in the epibiotic community of *R. exoculata* at different molt and life stages was confirmed for the Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev vent sites. Whatever the point in the life cycle, from eggs (only *luxR*) to the adults, or in the molt cycle, *luxS* or *luxR* gene phylogenetic analyses clustered the bacteria in a single clade per site of origin. This makes *lux* genes good candidates for biogeographical purposes, *luxR* being more accurate. These results also indicate that eggs are colonized by epibionts from the adults of the same location and confirm the epibiotic population shift toward *Gammaproteobacteria* (*luxR* gene analyses Fig 6). Juveniles studied here were already recruited among adult aggregates and had the same epibiotic population as the adults of the same site. Therefore, recruited juveniles might i) be recruited from the larval pool of the same site without a migration event or ii) would have migrated and subsequently rid themselves of their original epibiont population (during a molt event, for example) and be already newly colonized by the local epibiont population with better fitness. To decide between these two hypotheses, samples from free larvae collected from the bottom seawater will need to be amplified and compared. Finally, RT-PCR experiments revealed gene expression and thus potential QS activity of epibiont shrimps from the TAG, Snake Pit and Rainbow deep sea hydrothermal vent sites. Functions associated with biofilm formation in pathogenic *Epsilonproteobacteria* are regulated by the AI-2 signal [48], [60], [76], [77], [78], [79], [80]. We can therefore hypothesize that *R. exoculata* gill chamber colonization by the epibiont

community at each molt could be sustained by AI-2 and several LuxR solo proteins that could intercept this QS signal as well as compounds from the host. Future efforts leading to the development of a genetic system in vent *Proteobacteria* would help us to better understand the *luxS* / AI-2 QS system in hydrothermal environments.

Acknowledgements

The authors thank the LBCM (EA 3884) for the on-line LC-MS-MS work and GATC Biotech for the sequencing work. We thank all the chief scientists, ship captains, crews and submersible teams of the oceanographic cruises for their efficiency. This work was supported by Ifremer, LabexMer and Carnot Reximmu. We thank H. Mc Combie-Boudry for English edition. The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Jean-Baptiste P, Holm N. Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14'N, MAR). *Chem. Geol.* 2002;191: 345-359.
2. Kelley DS, Karson JA, Blackman DK, Früh-Green GL, Butterfield DA, Lilley MD, et al. An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30 degrees N. *Nature.* 2001;412: 145-149.
3. Williams AB, Rona PA. Two new caridean shrimps (bresiliidae) from a hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *J. Crust. Biol.* 1986;6: 446-462.
4. Teixeira S, Cambon-Bonavita MA, Serrão EA, Desbruyères D, Arnaud-Haond S. Recent population expansion and connectivity in the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* along the Mid-Atlantic Ridge. *J. Biogeography.* 2011;38: 564-574.

5. Teixeira S, Serrão EA, Arnaud-Haond S. Panmixia in a fragmented and unstable environment: the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* disperses extensively along the Mid-Atlantic Ridge. PLoS ONE. 2012;7(6): e38521.
6. Watabe H, Hashimoto J. A new species of the genus *Rimicaris* (Alvinocarididae: Caridea: Decapoda) from the active hydrothermal vent field, 'Kairei Field', on the Central Indian Ridge, Indian Ocean. Zool. Sci. 2002;19: 1167-1174.
7. Nye V, Copley J, Plouviez S. A new species of *Rimicaris* (Crustacea: Decapoda: Caridea: Alvinocarididea) from hydrothermal vent fields on the Mid-Cayman Spreading Centre, Caribbean. J. Mar. Biol. Assoc. 2012 UK doi: 10.1017/S.0025315411002001.
8. Komai T, Segonzac M. Taxonomic review of the hydrothermal vent shrimp genera *Rimicaris* Williams and Rona and *Chorocaris* Martin and Hessler (Crustacea: Decapoda: Caridea: Alvinocarididea). J. Shellfish Res. 2008;27(1): 21-41.
9. Schmidt C, Vuillemin R, Le Gall C, Gaill F, Le Bris N. Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps. Mar. Chem. 2008;108: 18-31.
10. Ravaux J, Cottin D, Chertemps T, Hamel G, Shillito B. Hydrothermal vent shrimps display low expression of the heat-inducible hsp70 gene in nature. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2009;396: 153-156
11. Polz M, Robinson JJ, Cavanaugh C, Van Dover CL. Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. Limnol. Oceanogr. 1998; 43: 1631-1638.
12. Zbinden M, Cambon-Bonavita MA. Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. FEMS Microbiol. Ecol. 2003;46: 23-30.

13. Durand L, Zbinden M, Cuff-Gauchard V, Duperron S, Roussel EG, Shillito B, et al. Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. FEMS Microbiol. Ecol. 2010;71: 291-303.
14. Durand L, Roumagnac M, Cuff-Gauchard V, Jan C, Guri M, Tessier C, et al. Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* resident gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites. FEMS Microbiol Ecol. 2015 Oct 91(10). pii: fiv101. doi: 10.1093/femsec/fiv101
15. Van Dover CL, Fry B, Grassle JF, Humphris S, Rona PA. Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. Mar. Biol. 1988;98: 209-216.
16. Casanova B, Brunet M, Segonzac M. L'impact d'une épibiose bactérienne sur la morphologie fonctionnelle des crevettes associées à l'hydrothermalisme médio-Atlantique. Cah. Biol. Mar. 1993;34: 573-588.
17. Segonzac M, de Saint Laurent M, Casanova B. L'énigme du comportement trophique des crevettes Alvinocarididae des sites hydrothermaux de la dorsale médio-Atlantique. Cah. Biol. Mar. 1993 ;34: 535-571.
18. Polz M, Cavanaugh C. Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995;92: 7232-7236.
19. Gebruk AV, Southward EC, Kennedy H, Southward AJ. Food sources, behaviour, and distribution of hydrothermal vent shrimps at the Mid-Atlantic Ridge. J. Mar. Biol. Assoc. 2000;80: 485-499.
20. Zbinden M, Le Bris N, Gaill F, Compere P. Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2004;284: 237-251.

21. Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, De Villardi de Montlaur C, Roussel E, Guyot F, et al. New insights in metabolic diversity among the epibiotic microbial communities of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2008;359: 131-140.
22. Corbari L, Cambon-Bonavita MA, Long GJ, Zbinden M, Gaill F, Compère P. Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. Biogeosciences. 2008a;5: 1295-1310.
23. Corbari L, Zbinden M, Cambon-Bonavita MA, Gaill F, Compère P. Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. Aquat. Biol. 2008b;1: 225-238.
24. Petersen JM, Ramette A, Lott C, Cambon-Bonavita MA, Zbinden M and Dubilier N. Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous Gamma- and Epsilonproteobacteria at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. Environ. Microbiol. 2010;12(8): 2204-2218.
25. Hügler M, Petersen G, Dubilier N, Imhoff J, Sievert SM. Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. PLoS One. 2011;6(1):e16018. doi:10.1371/journal.pone.0016018
26. Guri M, Durand L, Cuff-Gauchard V, Zbinden M, Crassous P, Shillito B, Cambon-Bonavita MA. Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. The ISME J. 2012;6: 597-609.
27. Ponsard J, Cambon-Bonavita MA, Zbinden M, Lepoint G, Joassin A, Corbari L, et al. Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers

- to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. The ISME J. 2013;7: 96-109.
28. Jan C, Petersen J, Werner J, Huang S, Teeling H, Glöckner FO, et al. The gill chamber epibiosis of deep-sea *Rimicaris exoculata* shrimp revisited by metagenomics and discovery of zetaproteobacterial epibionts. Environ microbiol. 2014;16: 2723-2738.
 29. Flores GE, Campbell JH, Kirshtein JD, Meneghin J, Podar M, Steinberg JI, et al. Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. Env. Microbiol. 2011 13:no. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02463.x.
 30. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases. 2002;8(9): 881-890.
 31. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Ann. Rev. Microbiol. 2002;56: 187-209.
 32. Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. PLoS Biol. 2007;5(11): e307.
 33. Szafranski KM, Deschamps P, Cunha MR, Gaudron SM, Duperron S. Colonization of plant substrates at hydrothermal vents and cold seeps in the northeast Atlantic and Mediterranean and occurrence of symbiont-related bacteria. Front Microbiol. 2015;6: 162.
 34. Rosa RD and Barracco MA. Antimicrobial peptide in crustaceans. ISJ. 2010;7: 262-284.
 35. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J. Bacteriol. 1970;104: 313–322.

36. Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*—sequence and function of genes encoding a 2nd sensory pathway. *Mol. Microbiol.* 1994;13: 273–286.
37. Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003;6: 191–197.
38. Henke J, Bassler B. Bacterial social engagements. *TRENDS in Cell Biology.* 2004;4(11): 648-656.
39. Shiner E, Rumbaugh K, Williams S. Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol.* 2005;29: 935-947.
40. Visick KL, Ruby EG. *Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006;9: 632-638.
41. Eberl L, Riedel L. Mining Quorum-sensing regulated proteins – Role of bacterial cell-to-cell communication in global gene regulation as assessed by proteomics. *Proteomics.* 2011; 11: 3070-3085.
42. Filloux A and Vallet I, Biofilm: set-up and organization of bacterial community. *Med Sci.* 2003;19(1):77-83.
43. Ferrer M, Werner J, Chernikova T, Bargiela R, Fernández L, La Cono V, et al. Unveiling microbial life in the new deep-sea hypersaline lake *Thetis*. Part II: a metagenomic study. *Environ Microbiol.* 2012;14: 268– 281.
44. Biswa P, Doble M. Production of acylated homosérines lactone by Gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS Microbiol.Lett.* 2013;343: 34–41.
45. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21: 319-46.

46. Cao YA, He SX, Zhou ZG, et al. Orally administered thermostable N-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. strain AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in Zebrafish. *Appl Environ Microb*. 2012;78: 1899–908.
47. Kaper JB, Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96: 15196–15201.
48. Rader BA, Campagna SR, Semmelhack MF, Bassler BL, Guillemin K. The quorum-sensing molecule autoinducer 2 regulates motility and flagellar morphogenesis in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 2007;189: 6109–611.
49. Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*. 2002;415(6871): 545-9.
50. Joint I, Tait K, Callow ME, et al. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science*. 2002;298: 1207.
51. Tait K, Joint I, Daykin M, et al. Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ Microbiol*. 2005;7: 229–40.
52. Tait K, Havenhand J. Investigating a possible role for the bacterial signal molecules N-acylhomoserine lactones in *Balanus improvisus* cyprid settlement. *Mol Ecol*. 2013;22: 2588–602.
53. Montgomery K, Charlesworth JC, LeBard R, Visscher PT, Burns BP. Quorum Sensing in Extreme Environments. *Life*. 2013;3: 131-148.

54. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. (describes the FFT-NS-1, FFT-NS-2 and FFT-NS-i strategies). *Nucleic Acids Res.* 2002;30: 3059-3066.
55. Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173(2):697-703.
56. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975; 94(3): 441–8.
57. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;17: 3389-402.
58. Letunic L, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 2012 doi: 10.1093/nar/gkr931.
59. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990;215: 403-410.
60. O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect.* 2000;2: 1207–1214.
61. Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd SE. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care.* 2008;8: 333-41.
62. Irie Y and Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008;322: 67–84.
63. Perez-Rodríguez I, Bolognini M, Ricci J, Bini E, Vetriani C. From deep-sea volcanoes to human pathogens: a conserved quorum-sensing signal in *Epsilonproteobacteria*. *ISME J.* 2015;9(5): 1222-34.
64. Nichols JD, Johnson MR, Chou CJ, Kelly RM. Temperature, not LuxS, mediates AI-2 formation in hydrothermal habitats. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009;68: 173–181.

65. Fuqua C. The QscR Quorum-Sensing Regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an Orphan Claims Its Identity. *J Bacteriol.* 2006; 188(9): 3169–3171.
66. Subramoni S, Venturi V. LuxR-family “solos”: bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology.* 2009;155: 1377–1385.
67. González JF, Venturi V. A novel wide spread interkingdom signaling circuit. *Trends Plant Sci.* 2013; 18: 167–174.
68. Hughes DT and Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6: 111–20.
69. Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure DD. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;40(1): 86-116.
70. Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol.* 2001;167: 366–74.
71. Fabri MC, Bargain A, Briand P, Gebruk A, Fouquet Y, Morineaux M, et al. The hydrothermal vent community of a new deep-sea field, Ashadze-1, 12°58'N on the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 2011;91(01): 1-13.
72. Papke RT, Ramsing NB, Bateson MM, Ward DM. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 2003;5: 650–659.
73. Cohan FM. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1475): 1985-96.

74. Dechaine EG, Bates AE, Shank TM, Cavanaugh CM. Off-axis symbiosis found: characterization and biogeography of bacterial symbionts of *Bathymodiolus mussels* from Lost City hydrothermal vents. *Environ Microbiol.* 2006;8: 1902–1912.
75. Chibal H, Masuda H, Lee S-Y, Fujioka K. Chemistry of hydrothermal fluids at the TAG active mound, MAR 26°N, in 1998. *GRL.* 2001;28: 2919-2922.
76. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun.* 1996;64: 2445–2448.
77. Ottemann KM, Lowenthal AC. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun.* 2002;70: 1984–1990.
78. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 2004;113: 321–333.
79. Rader BA, Wreden C, Hicks KG, Sweeney EG, Ottemann KM, Guillemin K. *Helicobacter pylori* perceives the quorum-sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. *Microbiology.* 2011;157: 2445–2455.
80. Plummer P, Sahin O, Burrough E, Sippy R, Mou K, Rabenold J et al. Critical role of LuxS in the virulence of *Campylobacter jejuni* in a guinea pig model of abortion. *Infect Immun.* 2012;80: 585–593.

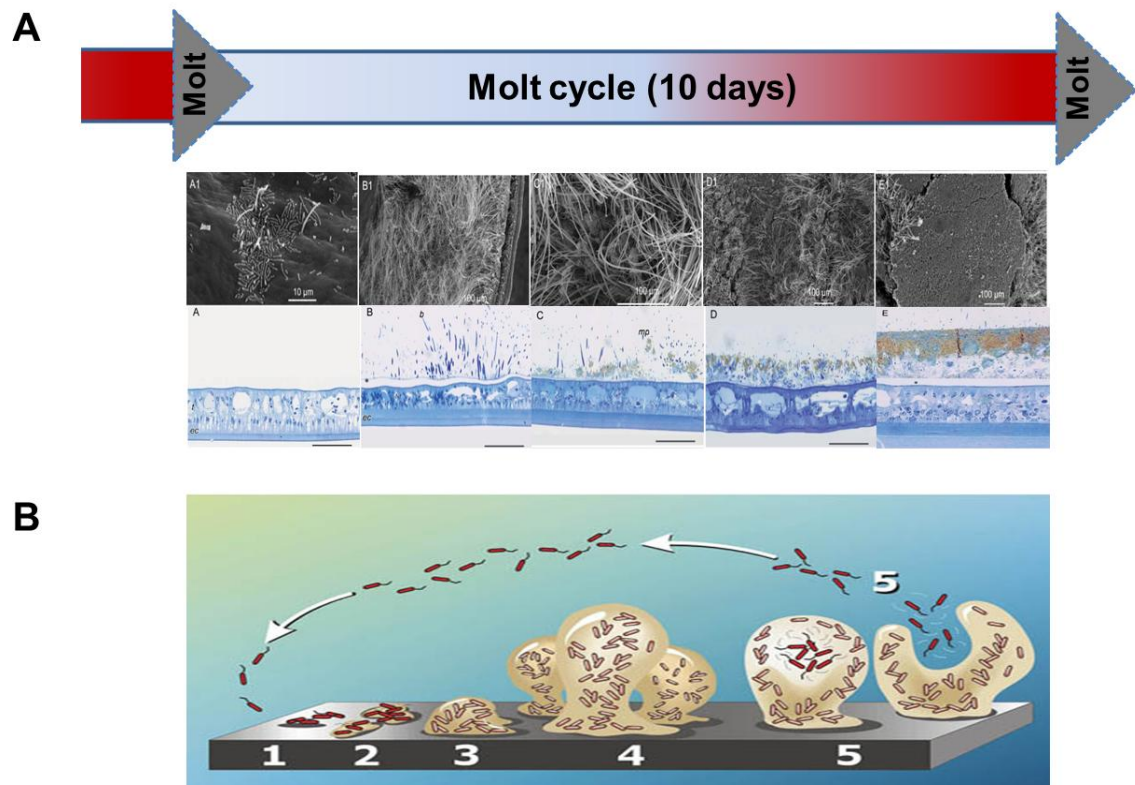


Figure 1 – Acquisition of symbionts in the gill chamber of *Rimicaris exoculata*. (A) Epibiontic colonisation through the molt cycle (adapted from Corbari *et al.*, 2008). (B) Biofilm formation (adapted from Monroe *et al.*, 2007).

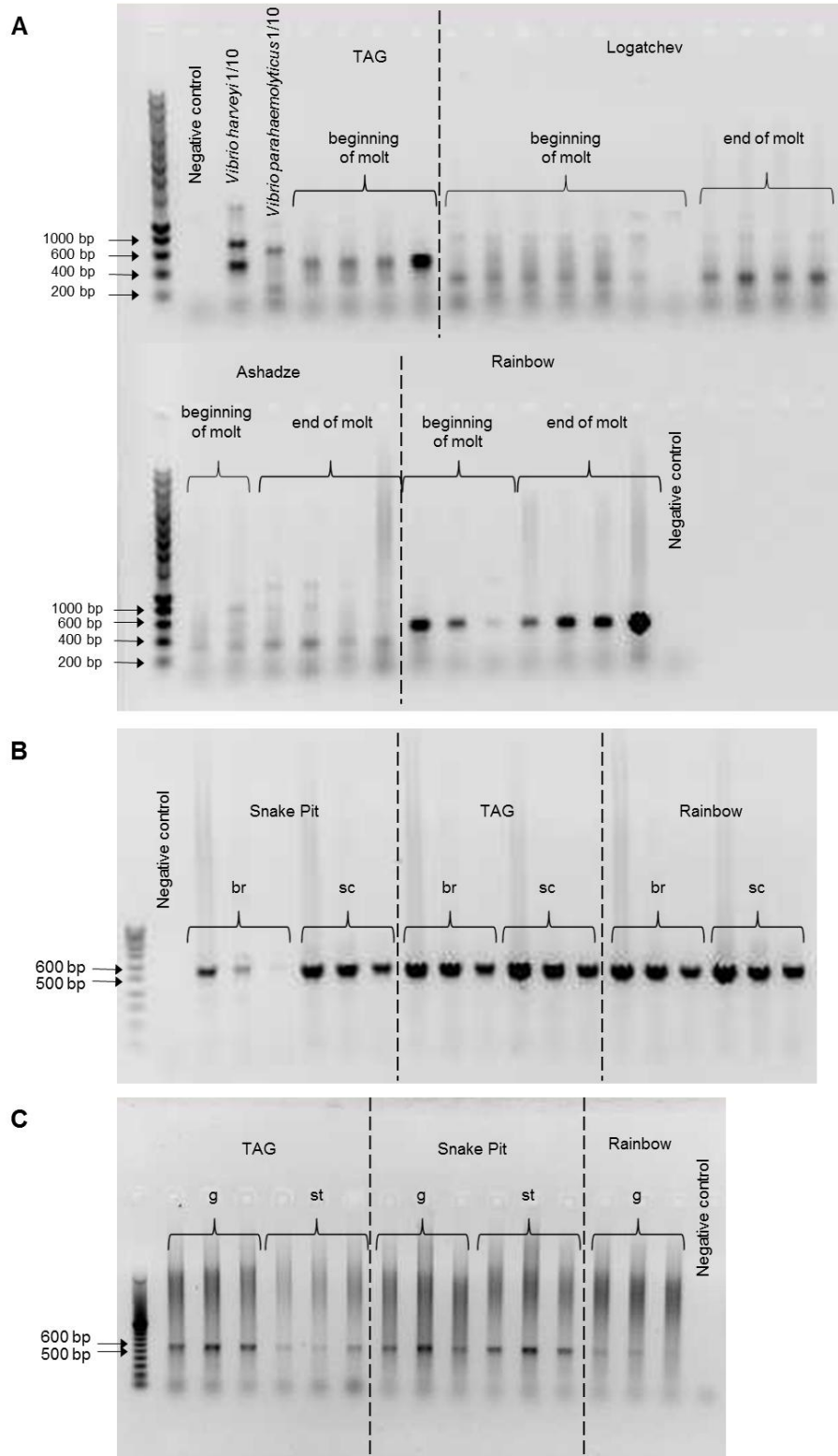


Figure 2 – Example of PCR on epibionts of the gill chamber of *R. exoculata*.

(A) *luxS* amplification. *luxS* genes from *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* were used as negative controls. (B) *luxR* amplification on branchiostegite (br) and scaphognathite (sc) epibionts. (C) *luxR* amplification on gut (g) and stomach (st) epibionts.

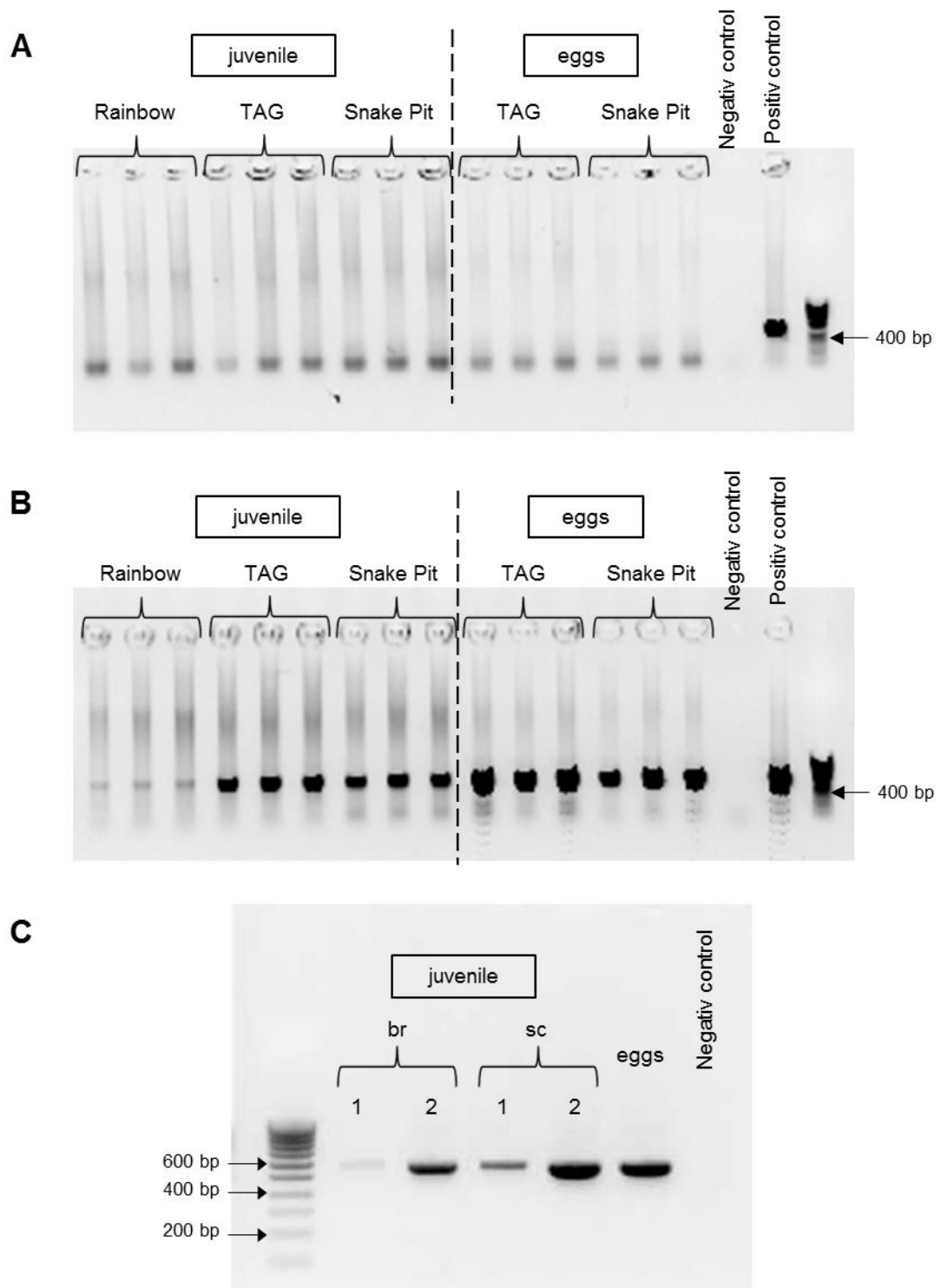


Figure 3 – *lux* genes PCR on epibionts of juveniles and eggs of *R. exoculata*.

(A) *luxS* amplification on scaphognathite and eggs. (B) *luxR* amplification on scaphognathite and eggs. (C) *luxR* amplification on (br) branchiostegite and (sc) scaphognathite at the beginning (1) and end (2) of the molt.

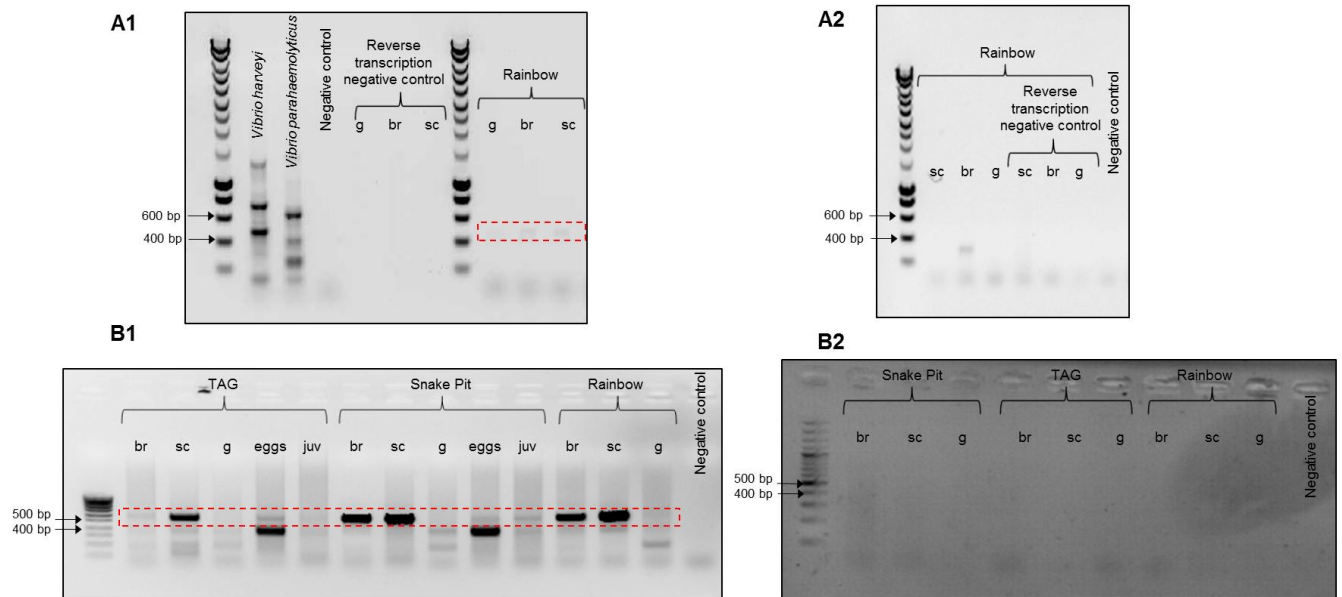
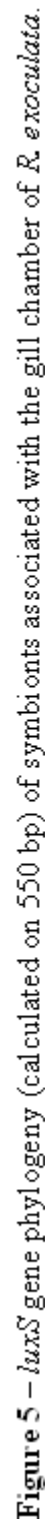


Figure 4 – Example of *lux* RT-PCR on epibionts of the gill chamber of *R. exoculata*.

Free RNase/DNase water was used as template for negative control. (A) *luxS* amplification were done on branchiostegite (br), scaphognathite (sc), and gut (g) epibionts for shrimp at the end of molt cycle from Rainbow. A1 end of molt and A2 beginning of molt cycle (B) *luxR* amplification were done on branchiostegite (br), scaphognathite (sc), gut (g), eggs and juvenile (juv) epibionts at the beginning (B2) and at the end (B1) of the molt cycle. Dotted box indicates the correct PCR size products. B2 has been was more contrasted to try to observe any amplification.



141

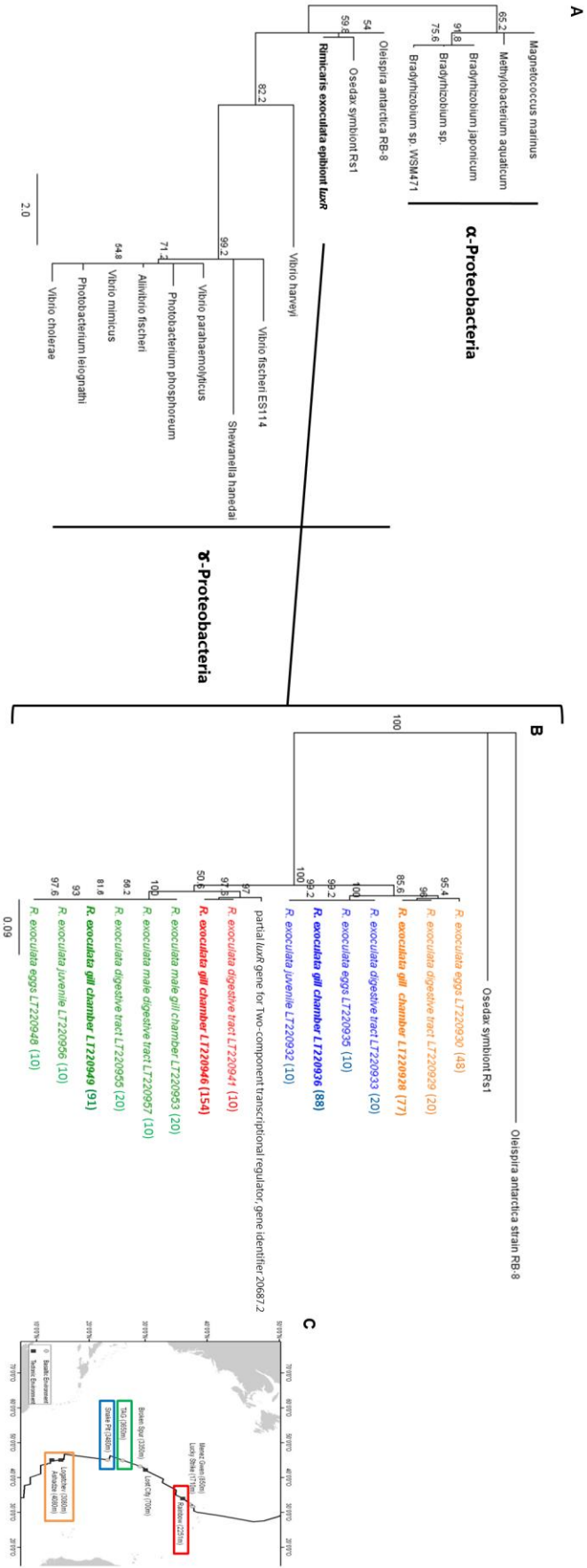


Figure 6 – *luxR* gene phylogeny (calculated on 560 bp) of symbionts associated with the shrimp *R. exoculata*.

The robustness was tested using 500 bootstraps resampling the tree using the Neighbor-Joining algorithm with the Kimura two-parameter correction matrix. (A) *luxR* affiliated to *Proteobacteria*. (B) *luxR* affiliated to *Gammaproteobacteria*. (C) Localizations of *R. exoculata* on hydrothermal vents and studied areas; red: Rainbow, green: TAG, blue: Snake Pit, orange: Losatchew (modified from Fabri et al 2011) Clone numbers are indicated between brackets

Supporting Information

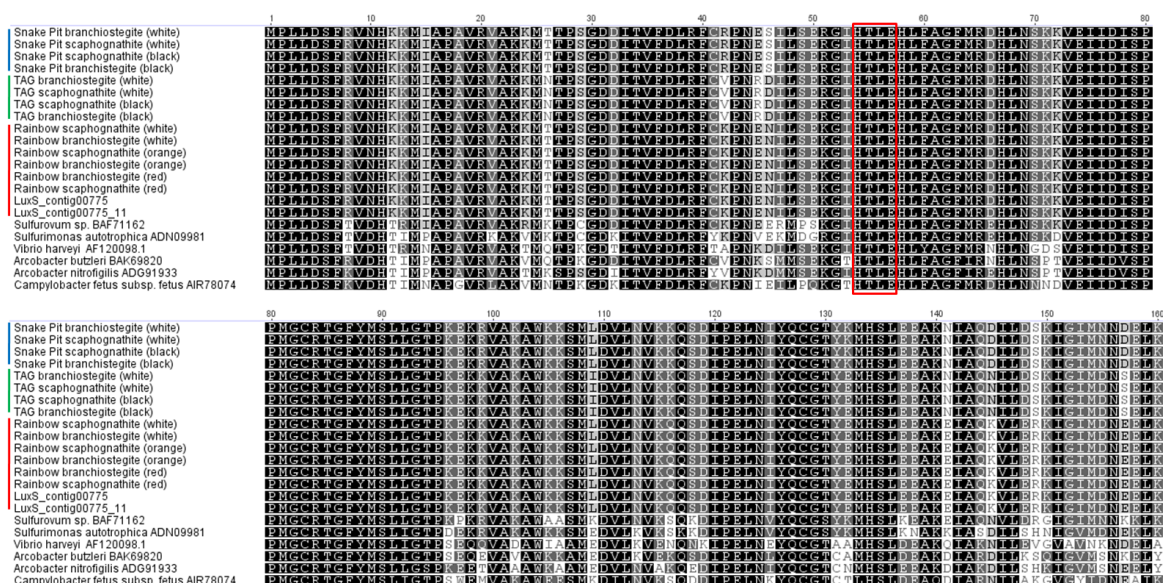
Bioinformatic studies

In silico, the LuxS protein sequence alignment shows three groups, which differ according to site (S1 Fig.). Amino acid variations between these three groups in positions 2, 11, 13, 29, 31, 32, 128, 132, 133, 134, 135, and 144 does not seem to indicate any particular tendency. Translated sequences revealed that the *luxS* gene found here has a conserved domain common to the *luxS* genes found in other species, which is essential for LuxS enzyme activity (S1 Fig., site 41-45, HTLEH) [1]. This distribution is valid whatever the colonized location (Br or Sc) and molt stage considered. Transcripts related to *Sulfurovum* and *Sulfurimonas* spp. were detected in a low temperature biofilm of an active vent, and the expression of these genes was also correlated with AI-2 activities and with a QS response in *V. harveyi* [2]. This implies that AI-2 signals can be produced *in situ*. As epibionts of *R. exoculata* are still not cultivable, no biochemical approaches could be used in this study. However, *luxS* gene transcripts were correctly amplified (RT-PCR) and the LuxS protein sequence is conserved and seems to be able to produce AI-2. Therefore, it is possible that at least some *Epsilonproteobacteria* epibionts would have AI-2 activity during the shrimp colonization processes. Indeed, *luxS*/AI-2 is conserved among *Epsilonproteobacteria* [2] which is the main phylotype found in the gill chamber epibiont community here. Moreover, despite QS signaling molecules, such as acylhomoserine lactones that appear to have inherent susceptibility to hydrolytic degradation, the precursor of AI-2 (DPD) is very stable over a broad pH range [3]. In line with this hypothesis, Nichols and colleagues demonstrated AI-2 production in the vent hyperthermophiles *Thermotoga maritima* and *Pyrococcus furiosus* grown in laboratory, via a *luxS*-independent biotic / abiotic reaction pathway [4]. This study showed the stability of AI-2 at elevated temperature. So it is possible that the epibiont

community of the gill chamber, living in environments characterized by harsh physicochemical conditions, communicated using AI-2, but as epibionts are not yet grown under laboratory condition, experiment to detect AI-2 could not be undertaken.

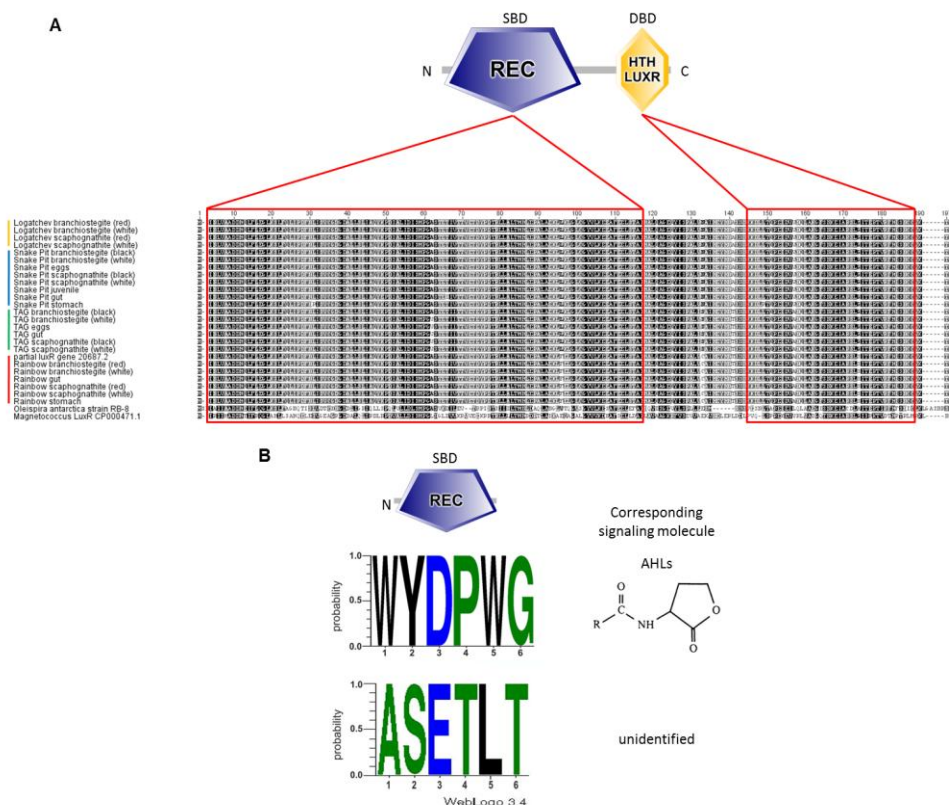
The LuxR protein alignment showed a C-terminal DNA-binding domain (DBD) with a helix- turn-helix motif, the “HTH LUXR” motif and an N-terminal signal-binding domain (SBD) connected with a short linker (S2A Fig). These two functional domains are found in LuxR-type receptors [5]. Moreover, RT PCR experiments gave expected size transcripts indicating expression of *luxR* genes. Usually, LuxR-type protein-sensing AHLs harbor six highly conserved amino acids in the N-terminus SBD that are important for signal-binding, signal molecule specificity and shaping the signal-binding pocket. These six conserved amino acids are W57, Y61, D70, P71, W85 and G113 (with respect to *Agrobacterium* sp. TraR, S2B Fig.), which are either hydrophobic or aromatic, displaying a conserved motif for AHL-sensors [6]. Bioinformatic analyses of *R. exoculata* epibiont LuxR amino acids at these positions revealed that the conserved WYDPWG-motif of the AHL-sensors was absent (S2B Fig.). However, the N-terminus SBD can harbor diverse domains that determine the signal-sensing specificity of the receptor [7]. The variability of the SBD domains enables bacteria to sense diverse signals, like exogenous AHLs, exogenous or endogenous non-AHLs, or eukaryotic signals, and can thereby influence different bacterial processes [8]. Since no *luxI* has yet been found in the epibiont metagenome [9], and no AHLs could be detected in our study (S3 Fig.), it is possible that these LuxR protein would be LuxR solos [8], [10], [11]. LuxR solos form a protein family highly similar to QS LuxRs, which does not possess an associated cognate LuxI protein. A recent study in the insect pathogen *Photorhabdus luminescens* found some LuxR solos, designated PluR, which respond to a new class of endogenously produced molecules, the α -pyrones, which are not AHLs [12]. Moreover, a

LuxR solo sub-family has been discovered that is only found in plant-associated bacteria that do not bind AHLs but instead bind plant produced compounds [11], [13], [14].



S1 Fig. LuxS protein sequences alignment.

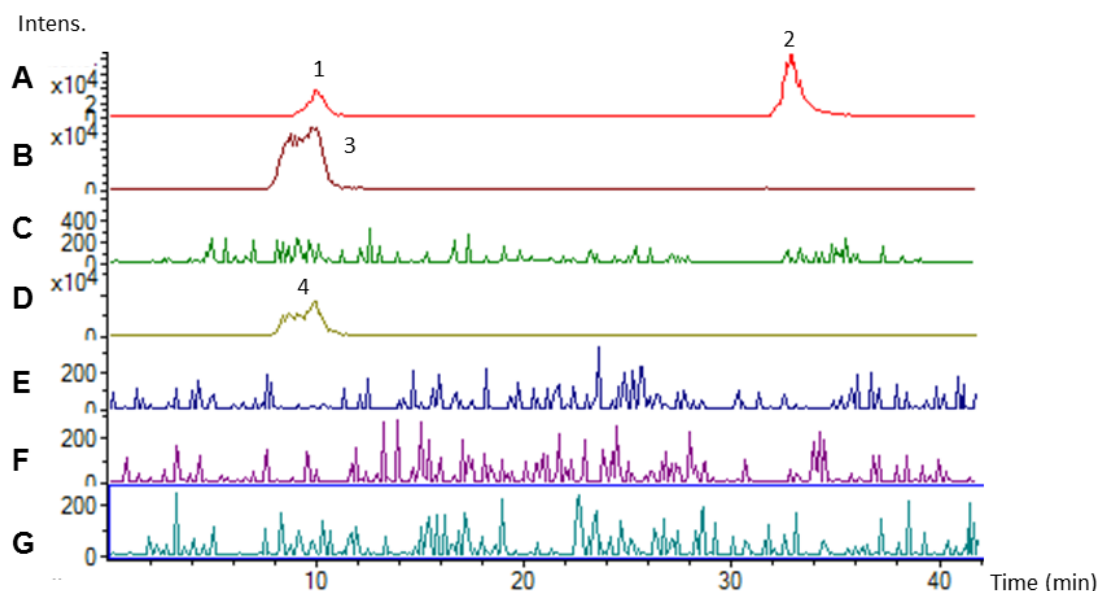
The words red/black, orange and white, are respectively used to describe the microbial mat at the end, intermediate stage, and beginning of the molt cycle. Black boxes indicate similarity of amino acids sequences. The red square shows a region necessary for the enzyme activity that is conserved in all *luxS* gene.



S2 Fig. LuxR protein analysis.

(A) LuxR protein sequence alignment. The words red/black and white are used to describe the microbial mat at the end and beginning of the molt cycle, respectively. Black boxes indicate similarity of amino acid sequences. LuxR type receptors share a modular domain structure, with a N-terminal signal binding domain (SBD) and a C-terminal DNA binding domain (DBD) with the conserved “HTH LUXR” motif (yellow hexagon). The N-terminus is marked with an N and the C-terminus with a C. LuxR were identified using BLAST [15] software and SMART 7 software [16]. (B) Conserved amino acid motifs of LuxR-type proteins from *Rimicaris exoculata* epibionts. **Upper part:** Motif of the six conserved amino acid positions in typical AHL sensors. Protein sequences of luxR from *Vibrio fischeri*, TraR from *Agrobacterium tumefaciens*, SdiA from *Escherichia coli*, QscR and LasR from *Pseudomonas aeruginosa* were used to generate the alignment [17]. **Lower part:** Motif of the six conserved

amino acids of LuxR from *Rimicaris exoculata* epibionts. All alignments were generated with Geneious software. The sequence logo was made with WebLogo3 [18].



S3 Fig. Chromatograph of *N*-acylhomoserine lactone extraction.

(A) C₄-AHL standard (1) and 3-oxo-C₁₂-HSL standard (2). (B) branchiostegite and C₄-AHL extraction control (3). (C) and (F) scaphognathite. (D) abdomen and C₄-AHL extraction control (4). (E) branchiostegite. (G) abdomen.

Several results demonstrate that bacterial QS signals can also be sensed by eukaryotic organisms. For instance, using AHL-producing and AHL-nonproducing *V. anguillarum* strains, the zoospores of the green alga of the genus *Enteromorpha* attach themselves to AHL producing bacteria biofilms [19]. A similar result has been reported for the zoospores of macroalgae of the genus *Ulva* [20] and cypris larvae of the barnacle *Balanus improvisus* [21], which are attracted to bacterial biofilms and preferentially settle on those of AHL-producing bacteria. Interkingdom communication via the QS can also be bidirectional. Indeed, Wu and colleagues showed that human stress molecules can be recognized by the QS system of *Pseudomonas aeruginosa* strains and can activate QS-regulated virulence genes [22]. Studies

involving animals have only described responses to OC₁₂-HSL, which induces an increased synthesis of IL-8 in human lung fibroblasts [23] and the acceleration of apoptosis in macrophages and neutrophils [24]. Data is still lacking on the perception of other AHL by animals [25]. This contrasts with the situation described for plants, which respond differentially to various AHLs and which, unlike animals, are not dependent upon the integrity of the AHL molecules. Finally, eukaryotes can produce compounds referred to as Quorum Quenching (QQ) actors, which interact directly with the compounds of bacterial QS to induce signal disturbance [26], [27], [28]. This indicates that a communication system between microorganisms and eukaryotes may exist at the cellular level, therefore, *R. exoculata* and its symbionts could communicate via the QS.

Extraction and quantification of *N*-acylhomoserine lactones (AHLs)

Extraction of AHLs

The AHL extraction protocol was adapted from Morin [29]. Internal membranes of branchiostegites, scaphognathites, exopodites, abdomens and guts of frozen and immersed *R. exoculata* (adult specimens of 3 to 3.5 cm long) were dissected and each part was weighed. The samples were ground in a FastPrep bead beater (10 sec, power 4, 4°C) in 700 µL of phosphate buffered saline-sea water using a microbead matrix and centrifuged (2 min, 8000 g, 4°C). For each sample, the supernatants were recovered and then combined and centrifuged (10 min, 10,000 rpm, 4°C) to remove cell debris. The clear supernatant was recovered and taken up in 20 ml of dichloromethane. The mixture was shaken by inversion for 3 minutes and the phases then separated by centrifugation (10 minutes, 4000 g, 4°C). The lower organic phase was recovered and a second extraction of the remaining aqueous phase was then carried out. The collected dichloromethane extracts were then combined, dried over anhydrous

magnesium sulfate (MgSO₄), filtered and evaporated to dryness at 30°C (Rotavapor, Buchi, Switzerland). Residues were dissolved in 1 mL of HPLC-grade acetonitrile (Carlo Erba), and filtered through a 0.45 µm PTFE syringe filter (Alltech, France). The sample was then stored for 24 to 48 hours, protected from light at -20°C, until analysis. All samples were stored within 48 hours of extraction.

Mass spectrometry analysis

Mass spectrometry analysis was performed by on-line LC-MS-MS [94]. Solutions of *N*-acyl or oxo-acylhomoserine lactones of 1, 2 and 5 mg / ml were used as internal standards only. The LC-separated compounds were detected by electrospray ionization ion trap mass spectrometry (ESI-MS) using a Bruker Esquire-LC spectrometer (Bruker Daltonic, Germany) under positive-ion conditions. The software used was Bruker Esquire-LC NT version 6.08 and Agilent Technologies ChemStation.

AHL study

The *luxI* gene was not recovered in previous attempts using metagenomic approaches [9]. However, as the metagenome is still incomplete, *luxI* might be present but not yet sequenced. To test this hypothesis, several AHL extractions were done in this present study. To test the effectiveness of extraction, a standard control (C₄-AHL) (2 µg / mL) was added to the sample. To test the effect of the waiting time on ice and light exposure, an inherent part of dissection of animals on board the vessel, a standard control was added at the time of dissection of Br and at the time of grinding muscles. Extractions were done in order to optimize the yield of AHLs at several key stages of the procedure. (i) Extractions were performed on several types of sample. An extraction was done on 15 shrimps per site (Rainbow, TAG and Snake Pit) at the beginning of a molt cycle and stored in

dichloromethane at -20°C. At the beginning of the cycle, the epibiont community was little developed. Extractions were then performed again on Rainbow shrimps using 30 shrimps to provide a sufficient quantity of symbionts for the AHL extraction. The same extraction was performed on shrimp from the Rainbow, TAG and Snake Pit sites at the end of the molt cycle, these specimens having been stored alive in dichloromethane at -20°C once aboard. Specimens at the end of the molt cycle provide a larger quantity of symbionts for AHL extraction. Another extraction was done on the whole gill chamber of 45 entire shrimps from the Rainbow site at the end of their molt cycles and stored at -20°C. As the gill chamber is almost closed, the liquid contained in the head, in which epibionts bathe, is mostly conserved during the freezing of the shrimp. Therefore, an extraction on the whole head should have allowed possible AHLs present in “the supernatant of the gill chamber” to be recovered. (ii) The recovery of AHLs in the solvent was done in two stages to optimize the recovery of all forms of AHLs: a first time with neutral pH, then a second time after aqueous stage acidification by the addition of chloric acid to favor the recovery of acid AHLs. (iii) The filtering of MgSO₄ was done with a glass fiber filter instead of a paper filter, as used previously, to avoid AHLs sticking to the filter. During the LC-MS-MS analysis, standard solutions of AHLs of known concentration were first injected, eluted in liquid chromatography and then passed through the mass spectrometer for calibration. Then solutions of extracted AHLs were analyzed in LC-MS-MS. The retention time and MS-MS spectra were compared with standard ones. Chromatographs were similar for all extractions (S3 Fig.). Spectrum B and D samples containing the control of extraction showed the presence of a peak in a retention time of 10 minutes corresponding to that of C₄-HSL (spectrum A). The areas under peak of the B and D spectra reveal a loss of one sixth of C₄-HSL during extraction if compared with area under peak of the standard passed alone (spectrum A). Sample spectra showed no specific retention time corresponding to the AHLs

targeted (S3 Fig.). M/z reports recorded after division gave readings of 102, but no m/z reports corresponded to acyl chains of AHLs. A search was performed on all the m/z of the AHL family in MS-MS. M/z report peaks recorded at 102 did not correspond to a known retention time. Despite all our attempts, no AHLs could be ever revealed during this study. Several hypotheses can be suggested. Firstly, this absence could be explained by quantities of AHLs in the sample being under the limit of the apparatus detection level (2 ng / μ L). Secondly, AHLs can undergo chemical degradation opening the lactone ring by addition of a water molecule. This phenomenon, called lactonolysis, occurs spontaneously in aqueous solutions [30], [31]. It is strongly favored at high temperature and under alkaline pH, and can be reversed in acidic pH solutions. Thirdly, as symbionts still cannot be cultured, the trials for extractions were done on intracellular AHLs, which are rapidly excreted into the surrounding seawater. So the concentration of intracellular AHLs is weaker than the extracellular concentration, although the latter would be difficult to collect using our approach, even with whole shrimp heads. Fourthly, sampling and shrimp recovery on board is a possible cause of stress (variation in pressure and temperature) for the epibionts, which could produce less AHLs as a result. Moreover, the conservation of shrimps in dichloromethane at -80°C over long periods may not be optimal for AHL preservation. The freezing / defrosting could also cause deterioration of AHLs. Long chain AHLs are less prone to degradation than short-chain AHLs [31]. The half-life of N-hexanoyl-homoserine lactone (C₆-HSL) varies from over 21 days (pH 5.5, 4°C) to less than 30 min (pH 8.5, 37°C) [30], [32]. Fifthly, the gill chamber could contain compounds that might interact negatively with AHLs, such as inhibitors [26], [27], [28]. Finally, *luxI* may not be present in the symbiotic population at all. All these reasons could contribute to explaining why AHLs were not detected in the epibiont community of the gill chamber.

References

1. De Keersmaecker SCJ, Sonck K, Vanderleyden J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *TRENDS in Microbiology*. 2006;14: 114-119.
2. Perez-Rodríguez I, Bolognini M, Ricci J, Bini E, Vetriani C. From deep-sea volcanoes to human pathogens: a conserved quorum-sensing signal in *Epsilonproteobacteria*. *ISME J*. 2015;9(5): 1222-34.
3. Globisch D, Lowery CA, McCague KC, Janda K. Uncharacterized 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) molecules revealed through NMR spectroscopy: implications for a greater signaling diversity in bacterial species. *Angew Chem Int Ed*. 2012;51: 4204–4208.
4. Nichols JD, Johnson MR, Chou CJ, Kelly RM. Temperature, not LuxS, mediates AI-2 formation in hydrothermal habitats. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;68: 173–181.
5. Nasser W, Reverchon S. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal. Bioanal. Chem*. 2006;387: 381–390.
6. Patankar AV, González JE. Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol. Rev*. 2009;33: 739–756.
7. Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol*. 2005;3(10):e334.
8. Subramoni S, Venturi V. LuxR-family “solos”: bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology*. 2009;155: 1377–1385.
9. Schmidt C, Vuillemin R, Le Gall C, Gaill F, Le Bris N. Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps. *Mar. Chem*. 2008;108: 18-31.

10. Fuqua C. The QscR Quorum-Sensing Regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an Orphan Claims Its Identity. *J Bacteriol.* 2006; 188(9): 3169–3171.
11. González JF, Venturi V. A novel wide spread interkingdom signaling circuit. *Trends Plant Sci.* 2013; 18: 167–174.
12. Brachmann AO, Brameyer S, Kresovic D, Hitkova I, Kopp Y, Manske C, et al. Pyrones as bacterial signaling molecules. *Nat.Chem.Biol.* 2013;9: 573–578.
13. Patel HK, Suárez-Moreno ZR, Degraffi G, Subramoni S, González JF, Venturi V. Bacterial LuxR solos have evolved to respond to different molecules including signals from plants. *Front Plant Sci.* 2013;4: 447.
14. Venturi V, Fuqua C. Chemical signaling between plants and plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 2013;51: 17-37
15. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990;215: 403-410.
16. Letunic L, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 2012 doi: 10.1093/nar/gkr931.
17. Brameyer S, Kresovic D, Bode HB, Heermann R. LuxR solos in *Photorhabdus* species. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4: 166.
18. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 2004;14(6):1188-90.
19. Joint I, Tait K, Callow ME, et al. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science.* 2002;298: 1207.
20. Tait K, Joint I, Daykin M, et al. Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ Microbiol.* 2005;7: 229–40.

21. Tait K, Havenhand J. Investigating a possible role for the bacterial signal molecules N-acylhomoserine lactones in *Balanus improvisus* cyprid settlement. *Mol Ecol*. 2013;22: 2588–602.
22. Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, Kohler JE, et al. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*. 2005;309(5735): 774-7.
23. Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol*. 2001;167: 366–74.
24. Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, Standiford TJ, Ishiguro M, Yamaguchi K. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun*. 2003;71: 5785–93.
25. Hughes DT and Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6: 111–20.
26. Shiner E, Rumbaugh K, Williams S. Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol*. 2005;29: 935-947.
27. Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure DD. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;40(1): 86-116.
28. Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*. 2001;411: 813-7.
29. Morin D, Grasland B, Vallée-Réhel K, Dufau C, Haras D. On-line high-performance liquid chromatography–mass spectrometric detection and quantification of N-

- acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *Journal of Chromatography A*. 2003;1002: 79–92.
30. Byers JT, Lucas C, Salmond GPC, Welch M. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol*. 2002;184: 1163–1171.
31. Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, et al. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 2002;70(10): 5635-46.
32. Delalande L, Faure D, Raffoux A, Uroz S, D'Angelo-Picard C, Elasri M, et al. N-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005;52(1):13-20.

4. Principaux résultats de l'étude

La présence des gènes *luxS* et *luxR* dans la communauté épibiontique de *R. exoculata* à différents stades de la mue et de vie a été confirmée pour les sites hydrothermaux Rainbow, TAG, Snake Pit et Logatchev. Les expériences de RT-PCR ont montré l'expression des gènes *luxS* et *luxR*, suggérant une potentielle activité de QS chez les crevettes des sites TAG, Snake Pit et Rainbow. Quel que soit le stade du cycle de vie (des œufs aux adultes), ou le stade du cycle de mue, les analyses phylogénétiques des gènes *luxS* et *luxR* ont mis en évidence un seul haplotype par site d'origine. Ces résultats semblent indiquer que les œufs sont colonisés par les épibiontes des adultes de la même localité, avec un shift de la population épibiontique des *Gammaproteobacteria* vers les *Epsilonproteobacteria* lors du développement de la crevette (analyse génétique *luxR*). Les juvéniles étudiés ici étaient déjà colonisés, et possédaient la même population épibiontique que les adultes du même site (regroupement des phylotypes par site et non par stade de vie ou sexe). Par conséquent, les juvéniles recrutés pourraient i) être recrutés à partir du pool larvaire du même site sans événement de migration ou ii) se débarrasser de leur population épibiontique d'origine (lors d'un événement de mue, par exemple), et être nouvellement colonisés par la population épibiontique locale possédant un meilleur « fitness ». Afin de trancher entre ces deux hypothèses, l'échantillonnage de larves libres devra être amplifié. Néanmoins, ces marqueurs *lux*, plus divergent que les gènes ribosomaux 16S, pourraient être utilisés dans les études de population pour tenter de retracer l'origine des individus d'un site hydrothermal ou entre les sites.

A l'heure actuelle aucun gène *luxI*, producteurs d'AHL, n'a encore été trouvé dans le métagénome incomplet des épibiontes (Jan et al., 2014). Il est donc possible que le gène *luxR* de cette étude code pour un récepteur LuxR solo (Fuqua, 2006, Subramoni et Venturi, 2009, González et Venturi, 2013). Les LuxR solos forment une famille de protéines très similaires aux récepteurs LuxR à AHL, qui ne possède pas de protéine LuxI associée. Une étude récente chez les insectes luminescents pathogènes *Photorhabdus* a décrit plusieurs LuxR solos, appelés PluR, capables de répondre à une nouvelle classe de molécules endogènes, les α -pyrones, qui ne sont pas des AHLs (Brachmann et al., 2013). En outre, une sous-famille LuxR solo a été découverte uniquement chez des bactéries associées aux plantes qui ne se lient pas aux AHLs, mais à des composés produits par les plantes (González et Venturi, 2013, Patel et al., 2013, Venturi et Fuqua, 2013). Ainsi, l'expression du gène *luxR* mise en évidence dans notre étude, pourrait coder pour un récepteur LuxR solo capable de répondre à des AHLs

produites par d'autres bactéries de la communauté épibiontique, ou à des composés produits par la crevette pendant la colonisation. D'autre part, notre étude *in silico* a permis de montrer que le gène *luxS* code pour une protéine LuxS fonctionnelle. Des études ont montré que les fonctions associées à la formation de biofilms d'*Epsilonproteobacteria* pathogènes sont régulés par le signal AI-2 (produit par LuxS) (Eaton et al, 1996; O'Toole et al., 2000; Ottemann et Lowenthal, 2002; Rader et al., 2007; Plummer et al, 2012). De plus, une étude a montré que des souches hyperthermophiles *Thermotoga maritima* et *Pyrococcus furiosus* étaient capables de produire des AI-2 (Nichols et al., 2009). On peut donc supposer que la communauté épibiontique colonisant le céphalothorax de *R. exoculata* après chaque mue pourrait être médiée par le signal AI-2 et plusieurs protéines LuxR solos pouvant intercepter ce signal de QS, ainsi que plusieurs composés de l'hôte. Il serait intéressant de compléter le métagénome des communautés symbiotiques de *R. exoculata* afin de rechercher la présence d'autres gènes *luxS* et de leurs récepteurs affiliés LuxP, LuxM, mais aussi de gènes *luxI* producteur d'AHLs et leurs récepteurs LuxR affiliés. En l'absence de gène *luxI*, la présence de nombreux gènes *luxR* conforterait l'hypothèse des LuxR solos capables de jouer le rôle d'intermédiaire entre l'hôte *R. exoculata* et ses symbiontes bactériens.

Enfin, malgré les diverses tentatives d'optimisation de l'extraction (incubation en aquarium pressurisé, conditionnement dans le solvant d'extraction etc...) et l'utilisation soit d'une souche rapportrice (*Chromobacterium violaceum*), soit de la spectrométrie de masse, aucune AHL n'a pu être mise en évidence durant cette étude. D'autres méthodes peuvent être envisagées pour détecter ces AHL comme l'utilisation de la technique de résonance plasmonique de surface ou la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Idéalement la recherche de potentielles séquences *luxI* dans le métatranscriptome des épibiontes du céphalothorax et leur expression dans un vecteur, permettrait de produire les AHLs en grande quantité dans le surnageant du biofilm et de mettre au point leur détection soit par une souche rapportrice, soit par spectrométrie de masse.



Chapitre 4

Identification de la *Re*-crustine, peptide antimicrobien impliqué dans l'ectosymbiose de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*.



1. Introduction de l'étude

Rimicaris exoculata est une crevette hydrothermale symbiotique hébergeant une communauté bactérienne dans sa cavité céphalothoracique et une dans son système digestif. La communauté symbiotique du céphalothorax est éliminée lors de chaque mue de l'hôte. Les symbiontes vont alors recoloniser l'hôte de manière identique après chaque mue suggérant un système de contrôle par l'hôte. Au sein du tractus digestif, les épibiontes sont localisés entre les microvillosités des cellules intestinales et sont non séptés. Cependant, le mode de contrôle de ces communautés par l'hôte reste à ce jour incompris. Les peptides antimicrobiens sont connus pour participer au contrôle de la symbiose en plus de la défense antimicrobienne chez les vertébrés et les invertébrés.

Les crustacés possèdent seulement un système immunitaire inné leur permettant de se protéger contre l'installation de microorganismes indésirables (Rosa et Barracco, 2010). Les peptides antimicrobiens (PAMS) sont l'un des composants majeurs de l'immunité innée (Brown et Hancock, 2006; Hancock et al, 2006). Les crustines sont des PAMS présents chez divers crustacés, comprenant les crabes, les homards, les écrevisses et les crevettes (Donpudsa et al, 2010; Mu et al, 2011; Jiang et al, 2015). Ces PAMS sont riches en cystéines cationiques. Ils contiennent un peptide signal, une région riche en glycines et/ou en cystéines, ou riche en prolines en N-terminale et un motif "whey acidic protein" (WAP) dans la partie C-terminale (Hauton et al, 2006; Smith et al, 2008; Supungul et al, 2004). Les crustines peuvent être divisées en quatre types, à savoir, les crustines de types I, II, III et IV selon leur structure (Tassanakajon et al, 2015). La plupart des études révèlent que les crustines ont des activités protéases inhibitrices et antimicrobiennes (Smith et al, 2008; Arockiaraj et al, 2013).

Bien que beaucoup de PAMS aient été découverts chez les crustacés (Zhao et al, 2008; Tassanakajon et al, 2011; Rosa et Barracco 2010), aucune étude n'a été effectuée sur le système immunitaire des crevettes dans un contexte de symbiose bactérienne. Actuellement, un seul PAM hydrothermal (l'alvinellacine) a été décrit chez le ver *Alvinella pompejana* (Tasiemski et al., 2014). L'alvinellacine semble agir comme une première ligne de défense contre l'invasion microbienne et semble participer activement au contrôle de la communauté épibiontique. L'immunité de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* et son implication dans le contrôle de ses deux communautés symbiotiques bactériennes restent à ce jour inconnu. Une séquence partielle d'un peptide antimicrobien avait été mis en évidence lors d'un stress thermique effectué sur *Rimicaris exoculata* (Cottin et al., 2010). Le but de notre étude est donc de décrire ce nouveau PAM hydrothermal chez la crevette *Rimicaris exoculata*.

Pour cela, la structure de son ADNc et sa distribution dans les différents tissus, colonisés ou non par les symbiontes, au cours des différentes étapes de la vie de la crevette sont étudiées. Enfin, son rôle dans l'immunité et le contrôle des symbiotes chez *R. exoculata* est discuté.

2. Méthode expérimentale utilisée

Les ARN totaux ont été extraits à partir des pièces buccales, des branchies, du tube digestif, de l'estomac, d'œufs, de juvéniles et de *Rimicaris exoculata* adultes conservés dans du TRIzol. Des expériences de RT-PCR ont ensuite été menées afin d'obtenir la séquence codante entière du peptide antimicrobien et ainsi de l'identifier. L'analyse de l'expression de ce PAM dans les différents tissus de la crevette à différents stades de mue et de cycle de vie, est réalisée par RT-PCR quantitative relative. Enfin des Western blot sont réalisés afin de confirmer la synthèse de ce peptide dans les différents tissus.

3. Article :

Identification de la *Re*-crustine, peptide antimicrobien impliqué dans l'ectosymbiose de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata*.

(En préparation)

Identification of *Re*-crustin, an antimicrobial peptide implicated in the vital ectosymbiosis of the extremophile vent shrimp *Rimicaris exoculata*.

Simon Le Bloa^{a,b,c}, Céline Boidin-Wichlaz^d, Valérie Cueff-Gauchard^{a,b,c}, Bruce Shillito^e, Marie-Anne Cambon-Bonavita^{a,b,c}, Aurélie Tasiemski^{d*}.

^a Ifremer, Centre Bretagne, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, DEEP/LM2E, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, ZI Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France.

^b Université de Brest, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, Technopôle Iroise, 4 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

^c CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, Technopôle Iroise, 4 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

^d Université de Lille-CNRS UMR8198, Evo, Eco and Paleo unit (EEP), SPICI group, Villeneuve d'Ascq, France.

^e Sorbonne Universités, Univ Paris 06, UMR CNRS 7208 BOREA (MNHN, UPMC, IRD, UCBN, UA), 7 Quai St-Bernard, Bat. A, 75005 Paris, France

*Correspondance : Aurélie Tasiemski, Université de Lille1-CNRS UMR8198, cité scientifique, bat SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex

Phone : +33(0)320335957

E-mail: aurelie.tasiemski@univ-lille1.fr

Key words: crustacean, immunity, hydrothermal vents, symbiosis, AMP, *Rimicaris exoculata*

Running title: First antimicrobial peptide from an extremophile arthropod

Abstract

The hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* can thrive in extremophile habitat through its vital bacterial symbiosis confined into its gill chamber and gut. In the gill chamber, the ectosymbiotic community, mostly composed of *Proteobacteria* takes place at the subadult stage and is renewed after each molt that occurs during the life of the shrimp. Thanks to their immune system, hosts can maintain and control their symbionts, and prevent the establishment of pathogens. In addition to their role in fighting against microbial pathogens, antimicrobial peptides (AMPs) have been shown to play functions in the symbiostasis in both invertebrates and vertebrates. Here we describe the molecular identification of an AMP (namely *Re-crustin*), in the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. The cDNA encodes a signal peptide directly followed by the active protein that harbors a conserved 8 cysteine residues motif which is typical of the WAP domain of the type II crustins. RT qPCR combined with Western blot analysis show a constitutive expression of *Re-crustin* in all tissues in contact with the environment with a higher expression in the parts of the gill chambers on which the ectosymbiotic community develops. Looking at the temporal dynamic of the *Re-crustin* production during acquisition events, loss and recolonization of symbionts post molting, suggests a participation of this AMP in the control of the ectosymbiosis in *Rimicaris exoculata*. Altogether, these data report the first description of an AMP in an extremophile arthropod and support the role of the immune system in the adaptation to extreme environment through the establishment of vital ectosymbiosis.

1. Introduction

Hydrothermal ecosystems are characterized by high pressure, extreme temperature gradient, no light and contrasted geochemical conditions including life toxic elements (Charlou et al., 2010; Kelley et al., 2001). These ecosystems are sustained by microbial chemosynthesis in place of photosynthesis (Karl, 1995). The important animal biomass observed around hydrothermal vents (Desbruyères et al., 1997; Wolff, 2005) is based on the existence of these chemosynthetic prokaryotic communities. The caridean shrimp *Rimicaris exoculata* dominates the fauna at several hydrothermal vent sites of the Mid-Atlantic Ridge (MAR) (Williams and Rona, 1986) and lives with two distinct symbiotic microbial communities: one in its gut (Polz et al., 1998; Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Durand et al., 2010 and 2015), and one in its gill chamber (Van Dover et al., 1988; Casanova et al., 1993; Segonzac et al., 1993; Polz and Cavanaugh, 1995; Gebruk et al., 2000; Zbinden et al., 2004, 2008; Corbari et al., 2008a, 2008b; Petersen et al., 2010; Hügler et al., 2011; Guri et al., 2012; Jan et al., 2014).

R. exoculata has an enlarged gill chamber which encloses hypertrophied mouthparts. The internal faces of the lateral carapaces (branchiostegite, Br) and the mouthparts (scaphognathite, Sc) are heavily colonized by only a few specific bacterial lineages (Segonzac et al., 1993; Zbinden et al., 2004; Petersen et al., 2010; Guri et al., 2012). This associated microbial diversity is much lower than the environmental one (Flores et al., 2011), suggesting a selection of the symbionts by the host. A recent study demonstrated the trophic involvement of ectosymbionts of the gill chamber (Ponsard et al., 2013). Every 10 days, the microbial community of the gill chamber, but not of the gut, is eliminated during the molt (Corbari et al., 2008) and ectosymbionts rapidly re-colonize the host to form a new community. On one hand the process of colonization is strictly similar for each individual and strictly located on

the same area of mouthparts and branchiostegite (Guri et al., 2012; Corbari et al., 2008). On the other hand, the gut symbionts, not subjected to the host molt, are not septed (Durand et al., 2010, 2015). All these data suggest a strict control of cell division by the host, probably to avoid invasion by its two symbiotic bacterial communities.

In beneficial bacterial-host interactions, hosts must protect themselves against inappropriate colonization and development of the symbiotic community. Various mechanisms are used to control the symbionts proliferation without compromising host vitality. Amongst them, beneficial partnerships between symbiotic bacteria and the immune reactions of the host have been widely invoked in mammals and insects (Dale and Moran 2008). The molecular interactions between the two partners seem to modulate host immunity, and in turn the immune system shapes the composition of the microbial community. The immune system of crustaceans is based on cellular and humoral responses (Jiravanichpaisal et al., 2007; Soderhall, 2015) including members of the prophenol oxidase cascade, and antimicrobial substances such as lysozyme and antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are keys components of the innate immune system that rapidly eradicate or incapacitate pathogenic agents such as viruses, bacteria, fungi, attempting to invade and proliferate in multicellular eukaryotes (Zasloff, 2002; Bulet et al., 2004; Maróti et al., 2011). Several types of AMPs, such as crustins, penaeidins, and styalicin, have been discovered in shrimps (Zhao et al., 2008; Tassanakajon et al., 2011; Rosa and Barracco 2010; Destoumieux-Garzon et al., 2016; An et al., 2016; Liu et al., 2016).

Crustins are cationic cysteine-rich AMPs that contain a signal peptide, a glycine-rich, cysteine-rich, or proline-rich region at the N-terminus and a whey acidic protein (WAP) domain at the C-terminus (Hauton et al., 2006; Smith et al., 2008; Supungul et al., 2004). The WAP domain contains eight cysteines with a conserved arrangement forming four disulfide bridges (Smith et al., 2008). The first crustin was identified in hemocytes of the shore crab

Carcinus maenas (Relf et al., 1999). Crustins can be divided into four types, namely, crustin types I, II, III and IV, according to the domain organization (Tassanakajon et al., 2015). Type I crustins have a variable cysteine-rich region between the signal peptide and WAP domain. These crustins mainly exist in crabs, lobsters, and cray fish (Jiravanichpaisal et al., 2007). Type II crustins mainly retrieved in shrimps (Sun et al., 2010) possess in addition to the cysteine-rich region, a glycine-rich region between the signal sequence and WAP domain. The glycine-rich region contains 40 to 80 amino acid residues, and the number of glycine residues varies in different species. Type III crustins exhibit a short proline and/or arginine-rich region between the signal peptide and WAP domain, instead of cysteine and glycine-rich regions. These type III crustins, also called single WAP domain-containing peptides (SWDs), have been discovered in many shrimps, such as the black tiger shrimp (Supungul et al., 2008), the kuruma shrimp (Jiang et al., 2013), and the Chinese white shrimp (Jia et al., 2008). Type IV crustins are composed of two WAP domains, but do not harbor any specific N-terminal sequence (Tassanakajon et al., 2015). Recent studies revealed that crustins are present in various crustaceans, including crabs, lobsters and crayfish (Donpuksa et al., 2010; Mu et al., 2011; Jiang et al., 2015). Adding to their antimicrobial properties, some crustins have been shown to possess protease inhibitory and phagocytic activities (Smith et al., 2008; Arockiaraj et al., 2013).

Although many AMPs have been discovered in crustaceans (Zhao et al., 2008; Tassanakajon et al., 2011; Rosa and Barracco 2010), no studies were ever conducted on the involvement of the shrimp immune system in bacterial symbiosis. In addition to their classical immune function, AMPs have been evidenced to shape, control and confine the symbiotic microbial community into specific anatomic compartments (gut, bacteriomes, skin...), thus contributing to the symbiostasis of both invertebrates and vertebrates (Salzman et al., 2009;

Gallo and Nakatsuji, 2011; Login et al., 2011; Franzenburg et al., 2013; Tasiemski et al., 2015).

The goal of this study was to identify an AMP and to investigate its function in the immunity and the symbionts control of the vent shrimp *Rimicaris exoculata*.

2. Materials and methods

1. Specimen collection

Rimicaris exoculata were collected at two MAR hydrothermal vents, TAG (26°08' N;-3640m) and Snake Pit (23°23' N;-3480m), with the Ifremer research vessel *Pourquoi Pas?* using the slurp gun of the remotely operated vehicles (ROV Victor 6000) during the oceanographic cruise BICOSE2014. The isobaric collection device PERISCOP (Shillito et al, 2008) was used when animals in good physiological state were required. Once aboard, 12 living *R. exoculata* specimens were immediately frozen at -80°C. Other 6 living specimens at different molt stages (early and late) and life stages (eggs, recruited juveniles (collected within adults aggregates) and adults) were dissected and pieces were stored in TRIzol ® Reagent (ambion) at -80°C.

2. Microbial challenge

Rimicaris specimens were recovered alive after sampling was achieved using the isobaric collection device PERISCOP (Shillito et al., 2008). After opening (decompression) of the isobaric cell, shrimps were immediately sorted and conditioned for further experiments. The microbial challenge experiment was performed on board at near *in situ* pressure using the pressurized incubator BALIST™ (Ravaux et al., 2013). A total of 16 shrimps were used in this study, divided into 4 groups. The first group (n= 4) called *in situ* was directly flash frozen in liquid nitrogen straight after collection and stored at -80°C until further use. The three other

groups were each transferred into 1L Nalgene bottles containing different media. The bottles were further sealed and stored into the pressurized aquarium BALIST™ for a 7-hour incubation experiment at 10°C, and at a pressure of 30 MPa (*in situ* pressure is approx. 35 MPa). The second group (n= 4) was incubated with one bacterial strain *Vibrio diabolus* HE800 and the third (n= 4) with a cocktail of two archaeal strains (*Pyrococcus abyssi* GY 855, *Methanococcoides vulcanii* SLH33) at 10⁵C/ml. A last control group (n= 4) was incubated with only sea water.. At the end of the experiment, shrimps were frozen in liquid nitrogen for further analyses. The survival rate was 100% for reference animals and for challenged animals.

3. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Tissues from branchiostegite, scaphognathite, gills, abdomen, stomach, hepatopancreas and eggs were ground in TRIzol ® Reagent (ambion) using FastPrep-24® 5G (rotor CoolPrep) MP. Entire shrimps (adults and juveniles) were ground in TRIzol ® Reagent (ambion) using the Ultra-Turrax T25 ® (IKA). RNA was extracted according to the manufacturer's instructions (Qiazol, Qiagen). The concentration of extracted RNA was estimated with the Qubit® RNA HS kit using the Qubit® 3.0 Fluorometer. RNA integrity was then evaluated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel under denaturing conditions. Extract RNA were treated by RQ1 RNase-free DNase (Promega) and used for cDNA synthesis with the RevertAid M-MuLV RT kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. The synthesized cDNA were stored at -20°C.

4. Re-crustin cDNA amplification and sequencing

The sequence of the *Re*-crustin was obtained by PCR using 2µg of template cDNA, with ReCrustinF forward primer 5'- GACAAACACCTCCTCCTCCTCCA -3' and oligo

(dT)₁₈ primer. Reaction mixtures for PCR amplifications contained 10 µM of each primer, 10 µM of each desoxynucleotide triphosphate, 5X Go Taq® Flexi green buffer (Promega), and 5U of GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega). The final volume was adjusted to 50 µl with sterile water. The PCR program involved an initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 39 cycles of 95°C for 1.5 min, 55°C for 1.5 min, and 72°C for 1.5 min, with a final elongation step at 72°C for 5 min. PCR products from each replicate were pooled and then purified with the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). Purified PCR products were cloned using the TOPO-TA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The insert size of positive *Escherichia coli* colonies was controlled by PCR screening with vector primers M13F and M13R. Then, clones were sequenced according to the Sanger method (Sanger *et al.*, 1994) on a 310 ABI prism (Applied Biosystems) with the Dye Deoxy™ Terminator technology.

5. Sequence analysis

Sequences were imported into Geneious® version 8.1 software (Biomatters, available from (<http://www.geneious.com/>)) and aligned with MAFT (Kato *et al.*, 2002). Then the phylogenetic affiliation was done by comparing our sequences with those present in international databases with the BLAST tool (Altschul *et al.*, 1997). The four-disulfide core (4-DSC) or WAP domain was identified using SMART7 (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2014) and the signal peptide was predicted by the SignalP 4.1 program (Petersen *et al.*, 2011)

6. Quantitative Reverse Transcription PCR

The primers used for quantification were designed with the Primer3 Input software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>).

- *Re*-crustin primers: forward: 5'-ACTGCTGTGAGAACGGGAAC-3'; reverse: 5'-AACATGTTTGAGGGGGTCCT-3'
- Rpl8 primers: forward: 5'- GAAGCTCCCATCAGGTGCCAAGAA-3' ; reverse 5'- TTGTTACCACCACCGTGAGGATGC-3'

The Rpl8 gene was used as the reference gene (Cotin et al., 2010). Real Time reactions were conducted on a CFX96 qPCR system (BioRad) using a hot start, then 40 cycles at 94°C, 15 s; 59°C, 1min; 72°C, 30 s., and a final extension step at 72°C for 3 min. Reference and target were amplified in separated wells. After PCR, a melting curve analysis was performed in order to demonstrate the specificity of the PCR products. *Re*-crustin primers tested generated a single and discrete peak in the dissociation curve (data not shown). A negative control and a 5 fold dilution series protocol of pooled cDNAs (from both control and infection treatments) were included in each run. The 5 fold dilution series were used to construct a relative standard curve to determine the PCR efficiencies and for further quantification analysis. In all experiments, all primer pairs gave amplification efficiencies of 90–100%. Each reaction was run in triplicate (technical replicates). Analysis of relative gene expression data was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method. For each couple of primers, a plot of the log cDNA dilution versus ΔC_t was generated to validate the qPCR experiments (data not shown).

7. Protein extraction and SDS PAGE

Total proteins were extracted from the same sample used for RNA extraction according to the manufacturer's instructions (Qiazol, Qiagen). The protein concentration was determined by the Bradford method using BSA as a standard (Bradford, 1976). Proteins were separated by a denaturing SDS-PAGE. The running gel was composed of 12% acrylamide (12% acrylamide ; Tris-HCL 1,5M, pH 8.8 ; 0,1% SDS; 0,1% ammonium persulfate ; 0,01% TEMED) and the stacking gel was composed of 4% acrylamide (4% acrylamide ; Tris-HCL

0,5M, pH 6.8 ; 0,1% SDS; 0,1% ammonium persulfate; 0,01% TEMED). A total of 22 µg of protein was loaded in Laemmli buffer (Tris 125mM pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, and 5% β-mercaptoethanol). Gels were run at 70 V for 15 min and then at 180 V for 20 min.

8. Western blot analysis

Western blot analysis was used to confirm the expression of *Re*-crustin protein. Proteins were separated by a denaturing SDS-PAGE as described above and then the SDS-PAGE gel was transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra; Amersham Biosciences) by electro blotting. After transfer, the gel was stained by coomassie blue and the membrane was blocked for 1 h in PBS containing 0.05% Tween 20 and 0.7% casein and then probed with the rabbit polyclonal anti-*Re*-crustin antibodies (1/300 dilution; PeproTech) in blocking solution overnight at 4°C. After washes with PBS/0.05%-Tween 20, the immunolabeled bands were detected using a peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (1/5000; 1 hour at room temperature). An ECL Western blotting kit (Amersham Biosciences) was used for chemoluminescence visualization with Kodak X-Omat AR film.

3. Results

3.1 Molecular identification of *Re*-crustin

The complete nucleotide sequence of *Re*-crustin was obtained from total RNA extracted from the shrimp *Rimicaris exoculata* (Figure 1) using a forward primer designed according the partial sequence found by Cottin and colleagues (Cottin et al., 2010) and an oligo (dT)₁₈ reverse primer. The *Re*-crustin cDNA encoded a propeptide of 190 amino acids residues. Analysis using Signal P software of the amino acid sequence deduced from the cDNA, showed the presence of a signal peptide, a glycine-rich and cysteine-rich, and a Whey

Acidic Protein (WAP) domain at the C-terminus, a structure that is characteristic of the Type II crustin family. Phylogenetic analysis of *Re*-crustin with other crustins from various crustaceans and insects confirmed that *Re*-crustin belongs to type II crustins (Figure 2), according to Tassanakajon classification (Tassanakajon et al., 2015).

Like most AMPs, *Re*-crustin is highly cationic with an isoelectric point (pI) of 8.49. The calculated molecular mass of the mature protein (175 amino acids) is 17.82 kDa.

3.2 Production sites of Re-crustin in adults

To better understand the role of *Re*-crustin in adults, the expression sites of the gene were determined by RT-qPCR performed on different pieces colonized (branchiostegite, scaphognathite, stomach, gut) or not (gills, hepatopancreas) by symbionts. Western blot using the anti-*Re* crustin antibody was performed to check the production of the active protein. The results presented in figure 3 show that *Re*-crustin is mainly synthesized by tissues that are in contact with the environment such as pieces of the gill chamber and in lower extent in the gut. The transcript and the protein were detected neither in the hepatopancreas nor in the stomach. The best producers are clearly pieces on which the ectosymbiotic community of the gill chambers develops i.e. the branchiostegite and scaphognathite (Figure 3A).

3.3 Production sites of the Re-crustin in link with the dynamic of symbionts colonization of the gill chambers during the life of Rimicaris exoculata

Because *Re*-crustin is mostly expressed in the branchiostegite and the scaphognathite, the level of production of *Re*-crustin was estimated at different stages of life for which the colonization state of these pieces is known. Data showed that *Re*-crustin transcript is expressed all along the life cycle stages tested here (eggs, juveniles and adults) (Figure 4A).

The higher expression level occurs at the recruited juvenile stage. These tendencies were correlated with Western blot analyses (Figures 3B and 4B).

Effect on the *Re*-crustin gene expression of exogenous bacterial and archaeal competition with the gill chamber symbiont community was then investigated. Adults were bathed or not (control) with alive hydrothermal *Proteobacteria Vibrio diabolicus* and a cocktail of two archaeal strains (*Pyrococcus abyssi* GY 855, *Methanococcoides vulcanii* SLH33) at *in situ* pressure and the gene expression level of *Re*-crustin mRNA levels, was quantified by RT qPCR. No significant differences in the *Re*-crustin expression levels were observed between the control group and the *in situ* group (Figure 5A) suggesting that the collection process and subsequent pressure incubation had not impacted *Re*-crustin expression. The *Re*-crustin transcripts expression levels as well as the proteic level decreased upon *Vibrio diabolicus* and archaeal challenges (Figures 5B).

4. Discussion

Here we described for the first time a microbial peptide in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: the *Re*-crustin. In crustacean, crustins are a class of cationic, cysteine rich antimicrobial peptide (6-22 kDa; pI 4-8) containing a WAP domain (Tassanakajon et al., 2015). They are widely distributed across crustaceans (see review Rosa and Barracco 2010).

The *Re*-crustin was detected in all tested tissues and epithelia in contact with the environment as observed for most AMPs (Zasloff, 2002; Bulet et al., 2004; Maróti et al., 2011) (Figure 3 and 4). The presence of a signal peptide in the *Re*-crustin precursor (Figure 1) together with the results obtained by Western blot (Figure 3B and 4B), indicate that *Re*-

crustin is released into the extracellular compartment where it may exert its biological properties. Immunohistochemistry are currently performed to precisely locate the site of accumulation of the AMPs.

Re-crustin is mainly expressed in the gill chamber tissues (Figure 3) where the most important *R. exoculata* ectosymbiont community is located (Van Dover et al., 1988; Casanova et al., 1993; Segonzac et al., 1993, Polz and Cavanaugh, 1995; Gebruk et al., 2000; Zbinden et al., 2004; 2008; Corbari et al., 2008a, 2008b; Petersen et al., 2010; Hügler et al., 2011; Guri et al., 2012). The *R. exoculata* enlarged gill chamber offers a protective environment for the symbionts against the arch hydrothermal vent conditions (Van Dover 2000), and the symbiont provide nutrient via a trancuticular transfer (Ponsard et al., 2013). During the extremely short molt cycle (10 days), the symbiont growth is accompanied by a progressive minerals accumulation caused in part by the symbionts activities (Jan et al., 2014). In pre-ecdysial advanced stage, the mineral crust completely surrounds the symbionts and some lysis forms can be observed (Corbari et al., 2008a, 2008b). This recovery could "stifle" the symbionts that would no longer be able to properly feed their host. The host may so trigger its molt to recycle its ectosymbionts. Thereby, the *R. exoculata* molt cycle could be compared to the concept of symbiotic trade-off retrieved in insects (Masson et al., 2016) where insect offers "board and lodging" to the endosymbiont as long as it can relies on their metabolic supply, and recycled them by autophagy and apoptosis, and here molt event, when the cost of symbiont maintenance overcomes the benefit provided.

Re-crustin is more expressed in the colonized mouth parts than in the gills (Figure 3). It suggests that *Re*-crustin might prevents the colonization of other bacteria on the colonized mouth parts. *Re*-crustin could be part of the *R. exoculata* "AMPs cocktail" that shape the

symbiont community and prevent the colonization of the gills. In fact, number of studies shows that native AMPs are typically expressed in combination (Nagaoka et al., 2000; Dosler et al., 2012). These expression patterns are assumed to support synergism between co-expressed AMPs. This patterns of co-expression is observed in many insects (Johnston and Rolff, 2013; Altincicek and Vilcinskas, 2007; Vogel et al., 2011; Barribeau et al., 2014) and nematodes (Dierking et al., 2016).

Contrary to the gill chamber, *Re*- crustin transcripts levels are very low in the gut and the stomach (Figure 3). This suggests that *Re*-crustin is not or partially involved in the the *R. exoculata* symbiont gut community control. In fact, microscopic observations of the *R. exoculata* gut symbiont community have showed numerous long and thin filaments, corresponding to individual cells without any visible septum (Durand et al., 2010). There must probably be a control by another AMP that still has to be identified. In the beetle belonging to the *Sitophilus* genus, endosymbiont are kept under control within the bacteriocytes thanks to the coleopteracin A (ColA) AMP (Login et al., 2011; Login and Heddi 2013). The ColA spatially restricts the symbionts in the bacteriocytes and inhibits their cytokinesis without impairing their metabolic activity and their ability to supply the host with nutritional component. This is the “endosymbiont domestication” concept (Login et al., 2011; Login and Heddi 2013). So there might be an “ectosymbiont domestication” of the gut symbiont community thanks to a "ColA like" *R. exoculata* AMP.

To assess the role of the *Re*-crustin in the immune response of *R. exoculata*, we conducted transcription and Western blot analysis of the cDNA following immune challenge with microorganisms isolated from the hydrothermal vent environments (Figure 5). We have used an immersion technique instead of injection, which is a more natural way of establishing

an infection, to study immune responses. The bacterial strain *V. diabolicus* HE800 and a cocktail of two archaeal strains (*P. abyssi* GY 855, *M. vulcanii* SLH33) lead to *Re*-crustin mRNA down regulation at 7h after incubation. These results suggest that *Re*-crustin seems not be an inducible gene in response to Gram negative bacteria and archaeal infections. However the response of crustin expression to bacterial challenge often does not follow the pattern expected for AMPs, following challenges from known pathogens (Gross et al., 2001; Lorget et al., 2005). A few authors have observed an unexpected down-regulation response of crustin transcript after bacterial challenge with Gram negative bacteria (Vargas-Albores et al., 2004; Supungul et al., 2008). For example, the *L. vannamei* Type II crustin expression decreases 12-24h following a *Vibrio alginolyticus* injection (Vargas-Albores et al., 2004). As we don't have yet expressed a *Re*-crustin recombinant, no microbial assays could be undertaken. Type II crustins are mainly active against Gram positive bacteria (Supungul et al., 2008; Sperstad et al., 2009a), even if only one Type II crustin from *Penaeus monodon* has showed strong antibacterial activity against both Gram positive and Gram negative bacteria (Amparyup et al., 2008). Future microbial challenges and microbial assays might have to be done with Gram positive bacteria to detect if *Re*-crustin is an immune inducible gene and is active against Gram positive bacteria.

The down regulation of the *Re*-crustin observed during archaeal challenge (Figure 5), suggests that this crustin is not involved in the defense against these microorganisms. Currently, nothing is known about the crustin activity against archaea. Most studies have been done on archaea from the human microbiome (see review Bang and Schmitz 2015). These archaea are characterized by their broad-spectrum resistance to antimicrobial agents (Dridi et al., 2011). In particular, their cell wall lacks peptidoglycan, making them resistant to antimicrobial agents interfering with peptidoglycan biosynthesis. Since crustins act as

disrupting or destabilizing the bacteria membrane, they would thereby not be efficient against archaea. So it is not so surprising that the expression level of *Re*-crustin is down regulated during archaeal challenge probably to allow the mobilization of the shrimp metabolism for the production of others PAMs, still to be identified.

Here we measure the *Re*-crustin expression levels from the eggs, juveniles and adults (before and after the molt) stages (Figure 4). As the *R. exoculata* life cycle is still incomplete (Guri et al, 2012; Hernandez-Avila et al., 2015) we could not measure the *Re*-crustin expression level at all postlarvae stages. Our results show that *Re*-crustin gene is expressed in the eggs but the PAM does not seem to be synthesized (western blot negative results). Then the *Re*-crustin gene expression increase from the eggs, still attached to the mother, to reach its higher expression level at recruited juveniles stage. The symbiont community acquisition is supposed occur during the larval development. During embryonic developments under the mother abdomen, eggs are covered with symbiont until hatching (Guri et al., 2012). Then larvae undergo development still poorly understood (Hernandez et al., 2015). Recruited juveniles are newly colonized by local epibionts (Le Bloa et al., under revision) and undergo several molts with several metamorphosis events to the adult stage. All this suggests that *Re*-crustin might participate to the initial selection and stabilization of the symbiont community during the development of the shrimp. Currently, no studies have tracked the sites of tissues expression during the shrimp development, so we do not know where the crustins are synthesized and stored in the early life stages of shrimp. A few studies have been done on the crustin expression during the early stages of crustacean's life (Hauton et al., 2007; Jiravanichpaisal et al., 2007; Smith et al., 2008). Hauton and colleagues have showed that crustin expression levels are similar in lobster *H. gammarus* postlarvae stages IV and VI (Hauton et al., 2007). Larvae of the shrimp *P. monodon* have been reported to express a

crustin transcript at high levels at all stages of development from nauplii IV through to juveniles (Jiravanichpaisal et al., 2007). Future efforts have to be done on the early larvae stages immunity to better understand the immune control during the symbiotic acquisition. Thereby immunocytochemistry and immunohistochemistry experiments could be done to detect if the *Re*-crustin is secreted in tissues and cells in contact with ectosymbionts during the shrimp development.

In conclusion, we have identified the first antimicrobial peptide in the hydrothermal shrimp *R. exoculata* and the second abyssal peptide: the *Re*-crustin. The full length cDNA and phylogeny analysis suggest that this peptide is a Type II crustin. The tissue distribution analysis indicates that *Re*-crustin is highly expressed in mouth parts regularly colonized by symbiont every ten days and in the juveniles. This suggests that this secreted crustin is involved in the *R. exoculata* immune system, and might participate to the control of the gill chamber ectosymbiotic community along the molt cycle and the shrimp development. Regarding the gut, *Re*-crustin is present at lower expression level. It could be implied in the cellular division inhibition of symbionts as ColA for insects, or could be relayed by another PAM. Our results are in favor of the trade-off hypothesis in line with symbiont domestication by the host. In order to further characterize the *Re*-crustin, the recombinant protein expression should be done. Then the purified peptide could be used for antimicrobial activity against Gram positive (*Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*) and Gram negative bacteria (*Vibrio diabolicus*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli* D31, *Vibrio* MPV19) and epibionts. Finally more sampling of each larval stage should be undertaken to track *Re*-crustin expression tissues localization during the shrimp development.

Acknowledgements

We thank all the chief scientist, ship captain, crews and submersible teams of the oceanographic BICOSE cruise for their efficiency. This work was supported by Ifremer, and LabexMer and ANR Carnot EDROME Institute. Pressure equipments used in this study were funded by a European Community program EXOCET/D (FP6-GOCE-CT-2003-505342), by an ANR grant, BALIST ANR-08-BLAN-0252, and by the University Pierre et Marie Curie, under the BQR UPMC 2008. The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Altincicek B, Vilcinskas A. (2007) Identification of immune-related genes from an apterygote insect, the firebrat *Thermobia domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**: 726–731.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **17**:3389-402.
- Amparyup P, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A (2008) Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol. Immunol.* **45**:1085–1093.
- An M, Gao J, Zhao X, Wang J (2016) A new subfamily of penaeidin with an additional serine-rich region from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) contributes to antimicrobial and phagocytic activities. *Dev Comp Immunol.* **59**:186-98.
- Arockiaraj J, Gnanam AJ, Muthukrishnan D, Gudimella R, Milton J, Singh A, et al. (2013) Crustin, a WAP domain containing antimicrobial peptide from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: immune characterization. *Fish Shellfish Immunol.* **34**:109e18.

- Bang C, Schmitz RA (2015) Archaea associated with human surfaces: not to be underestimated. *FEMS Microbiol Ecol.* **39**(5):631-48.
- Barribeau SM, Sadd BM, du Plessis L, Schmid-Hempel P (2014) Gene expression differences underlying genotype-by-genotype specificity in a host–parasite system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **111**:3496–3501.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248e54.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* **198**:169-84.
- Casanova B, Brunet M and Segonzac M (1993) L'impact d'une épibiose bactérienne sur la morphologie fonctionnelle des crevettes associées à l'hydrothermalisme médio-Atlantique. *Cah. Biol. Mar.* **34**:573-588.
- Charlou JL, Donval JP, Konn C, Ondreas H, Jean-Baptiste P, Fourre E & Fouquet Y (2010) High Production and fluxes of H₂ and CH₄ and 425 evidence of abiotic hydrocarbon synthesis by serpentinization in ultramafic-hosted hydrothermal systems on the Mid-Atlantic Ridge. *AGU Monograph Ser.* pp.265-296.
- Corbari L, Cambon-Bonavita MA, Long GJ, Zbinden M, Gaill F and Compère P (2008a) Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Biogeosciences.* **5**: 1295-1310.
- Corbari L, Zbinden M, Cambon-Bonavita MA, Gaill F and Compère P (2008b) Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquat. Biol.* **1**:225-238.
- Cottin D, Shillito B, Chertemps T, Tanguy A, Léger N, Ravaux J (2010) Identification of differentially expressed genes in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* exposed to heat stress. *Mar Genomics.* **3**(2):71-8.

- Dale C and Moran NA (2006) Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*. **126**: 453–465
- Desbruyères D, Biscoito M, Caprais JC, Colaço A, Comtet T, Crassous P, et al. (2001) Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep-sea Res. Pt I*. **48**:1325-1346.
- Desmoutieux-Garzón D, Rosa RD, Schmitt P, Barreto C, Vidal-Dupiol J, Mitta G, Gueguen Y, Bachère E. (2016) Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **26**; 371(1695).
- Dierking K, Yang W, Schulenburg H (2016) Antimicrobial effectors in the nematode *Caenorhabditis elegans*: an outgroup to the Arthropoda. *Phil. Trans. R. Soc. B*. **371**, 20150299.
- Dosler S, Gerceker AA (2012) In vitro activities of antimicrobial cationic peptides; melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against Gram-positive bacteria. *J. Chemother*. **24**: 137–143.
- Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. (2011) The antimicrobial resistance pattern of cultured human methanogens reflects the unique phylogenetic position of archaea. *J Antimicrob Chemother*. **66**: 2038–2044
- Donpudsa S, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A, Söderhäll I, Söderhäll K (2010) Characterization of two crustin antimicrobial peptides from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Invertebr Pathol*. **104**(3):234-8
- Durand L, Zbinden M, Cuff-Gauchard V, Duperron S, Roussel EG, Shillito B, et al. (2010) Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol*. **71**:291-303.
- Durand L, Roumagnac M, Cuff-Gauchard V, Jan C, Guri M, Tessier C, Haond M, Crassous P, Zbinden M, Arnaud-Haond S, Cambon-Bonavita MA (2015) Biogeographical

- distribution of *Rimicaris exoculata* resident gut ectosymbiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites. *FEMS Microbiol Ecol.* doi:10.1093/femsec/fiv101.
- Flores GE, Campbell JH, Kirshtein JD, Meneghin J, Podar M, Steinberg JI, *et al.* (2011) Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Env. Microbiol.* **13**:no. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02463.x.
- Franzenburg S, Walter J, Sven Künzel S, Jun Wang J, Baines JF, Bosch TC, Fraune S (2013) Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, E3730-3738.
- Gallo RL and Nakatsuji T (2011) Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol.* **131**(10):1974-80.
- Gebruk AV, Southward EC, Kennedy H and Southward AJ (2000) Food sources, behaviour, and distribution of hydrothermal vent shrimps at the Mid-Atlantic Ridge. *J. Mar. Biol. Assoc.* **80**:485-499.
- Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW (2001) Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. *Dev Comp Immunol.* **25**: 565–77.
- Guri M, Durand L, Cueff-Gauchard V, Zbinden M, Crassous P, Shillito B and Cambon-Bonavita MA (2012) Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME J.* **6**:597-609.
- Hauton C, Brockton V, Smith VJ (2006) Cloning of a crustin-like, single whey-acidic domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. *Mol Immunol.* **43**:1490e6.

- Hauton C, Brockton V, Smith VJ (2007) In vivo effects of immunostimulants on gene expression and disease resistance in lobster (*Homarus gammarus*) post-larval stage VI (PLVI) juveniles. *Mol Immunol.* **44**:443–50.
- Hernandez-Avila I, Cambon-Bonavita MA, Pradillon F (2015) Morphology of first Zoeal stage of four genera of Alvinocaridid shrimps from hydrothermal vents and cold seeps: implication for ecology, larval biology and phylogeny. *PLoS One.* **10**(12):e0144657.
- Hügler M, Petersen G, Dubilier N, Imhoff J and Sievert SM (2011) Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *PLoS One* **6**(1):e16018. doi:10.1371/journal.pone.0016018.
- Jan C, Petersen J, Werner J, Huang S, Teeling H, Glöckner FO, Golyshina OV, Dubilier N, Golyshin PN, Jebbar M and Cambon-Bonavita MA (2014) The gill chamber epibiosis of deep-sea *Rimicaris exoculata* shrimp revisited by metagenomics and discovery of zetaproteobacterial ectosymbionts. *Environ microbiol.* **16**: 2723-2738.
- Jia Y.P., Sun Y.D., Wang Z.H., Wang Q., Wang X.W., Zhao X.F., Wang J.X (2008) A single whey acidic protein domain (SWD)-containing peptide from fleshy prawn with antimicrobial and proteinase inhibitory activities. *Aquaculture.* 284:246–259.
- Jiang HS, Sun C, Wang T, Zhao XF, Wang JX (2015) A single whey acidic protein domain containing protein (SWD) inhibits bacteria invasion and dissemination in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* **35**: 310e8.
- Jiang HS, Jia WM, Zhao XF, Wang JX (2015) Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* **43**(2):387-95
- Jiravanichpaisal P, Lee SY, Kim YA, Andren T, Soderhall I (2007) Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. *Dev Comp Immunol.* **31**:441e55.

- Johnston PR, Rolff J. (2013) Immune- and wounddependent differential gene expression in an ancient insect. *Dev. Comp. Immunol.* 10–14.
- Karl D (1995) The microbiology of deep-sea hydrothermal vents. CRC Press.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. (describes the FFT-NS-1, FFT-NS-2 and FFT-NS-i strategies). *Nucleic Acids Res.* **30**:3059-3066
- Kelley DS, Karson JA, Blackman DK, Früh-Green GL, Butterfield DA, Lilley MD, et al. (2001) An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30 degrees N. *Nature.* **412**:145-149.
- Letunic L, Doerks T, Bork P (2014) SMART 7: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkr931.
- Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monegat C, Vigneron A, et al. (2011) Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science.* **334**: 362–365.
- Login FH and Heddi A (2013) Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. *J. Insect Physiol.* **59**: 232–239.
- Lorgeril J, Saulnier D, Janech MG, Guguen Y, Bachère E (2005) Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiol Genom.* **21**:174–83.
- Liu N, Lan JF, Sun JJ, Jia WM, Zhao XF, Wang JX (2016) A novel crustin from *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Dev Comp Immunol.* **49**(2):313-22.
- Maróti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P (2011) Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol.* **162**(4):363-374.
- Masson F, Zaidman-Rémy A, Heddi A (2016) Antimicrobial peptides and cell processes tracking endosymbiont dynamics. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci.* **26**:371(1695).

- Mu C, Zheng P, Zhao J, Wang L, Qiu L, Zhang H, Gai Y, Song L (2011) A novel type III crustin (CrusEs2) identified from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* **31**(1):142-7.
- Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M (2000) Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm. Res.* **49**: 73–79.
- Petersen JM, Ramette A, Lott C, Cambon-Bonavita MA, Zbinden M and Dubilier N (2010) Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous *Gamma*- and *Epsilonproteobacteria* at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environ. Microbiol.* **12**(8):2204-2218.
- Petersen TM, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods.* **8**:785-786
- Polz M, and Cavanaugh C (1995) Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:7232-7236.
- Polz M, Robinson JJ, Cavanaugh C and Van Dover CL (1998) Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnol. Oceanogr.* **43**:1631-1638.
- Ponsard J, Cambon-Bonavita MA, Zbinden M, Lepoint G, Joassin A, Corbari L, Shillito B, Durand L, Cuff-Gauchard V and Compere P (2013) Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME J.* **7**:96-109.
- Ravaux J, Hamel G, Zbinden M, Tasiemski AA, Boutet I, Léger N, Tanguy A, Jollivet D, Shillito B (2013) Thermal limit for metazoan life in question: *in vivo* heat tolerance of the Pompeii worm. *Plos One.* **8**(5): e64074.
- Rosa RD and Barracco MA (2010) Antimicrobial peptide in crustaceans. *ISJ.* **7**: 262-284.

- Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94** (3): 441–8.
- Relf J.M., Chisholm J.R., Kemp G.D., Smith V.J (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.* **264**: 350–357.
- Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjöberg J, Amir E, Tegatz P, et al. (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol.* **11**(1):76-83.
- Segonzac M, de Saint Laurent M and Casanova B (1993) L'énigme du comportement trophique des crevettes Alvinocarididae des sites hydrothermaux de la dorsale médio-Atlantique. *Cah. Biol. Mar.* **34**:535-571.
- Schultz J, Milpet F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(11):5857-64.
- Shillito B, Hamel G, Duchi C, Cottin D, Sarrazin J, Sarradin PM, Ravaux J, Gaill F (2008) Live Capture of Megafauna from 2300 m Depth, Using a Newly-Designed Pressurised Recovery Device. *Deep-Sea Research I.* **55**:881-889.
- Smith VJ, Fernandes JM, Kemp GD, Hauton C. (2008) Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev Comp Immunol.* **32**:758-772.
- Söderhäll I (2015) Crustacean hematopoiesis. *Dev Comp Immunol.* **58**:129-41.
- Sperstad SV, Haug T, Paulsen V, Rode TM, Strandskog G, Solem ST, et al. (2009a) Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Dev. Comp. Immunol.* **33**: 583-591.

- Sun C, Du XJ, Xu WT, Zhang HW, Zhao XF, Wang JX. (2010) Molecular cloning and characterization of three crustins from the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* **28**:517e24.
- Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A (2004) Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis. Aquat. Org.* **61**: 123–135.
- Supungul P, Tang S, Maneeruttanarungroj C, Rimphanitchayakit V, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A (2008) Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* **32**:61–70.
- Tasiemski A, Jung S, Boidin-Wichlacz C, Jollivet D, Cuvillier-Hot V, Pradillon F, et al. (2014) Characterization and function of the first antibiotic isolated from a vent organism: the extremophile metazoan *Alvinella pompejana*. *PLoS One.* **9**(4):e95737.
- Aurélien Tasiemski, François Massol, Virginie Cuvillier-Hot, Céline Boidin-Wichlacz, Emmanuel Roger, Franck Rodet, et al. (2015) Reciprocal immune benefit based on complementary production of antibiotics by the leech *Hirudo verbana* and its gut symbiont *Aeromonas veronii*. *Sci Rep.* **5**: 17498.
- Tassanakajon A, Amparyup P, Somboonwiwat K, Supungul P. (2011) Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Mar Biotechnol* **13**:639e57.
- Tassanakajon A, Somboonwiwat K, Amparyup P. (2015) Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **48**:324–341.
- Van Dover CL, Fry B, Grassle JF, Humphris S and Rona PA (1988) Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar. Biol.* **98**:209-216.

- Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G, Jimenez-Vega F, Avila-Villa A (2004) Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **138**:415–22.
- Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskas A (2011) A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics.* **12**, 308.
- Williams AB and Rona PA (1986) Two new caridean shrimps (bresiliidae) from a hydrothermal field on the Mid-Atlantic Ridge. *J. Crust. Biol.* **6**:446-462.
- Wolff T (2005) Composition and endemism of the deep-sea hydrothermal vent fauna. Roscoff, France, Ed. de la station biologique.
- Zaslhoff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* **415**:389-395.
- Zbinden M and Cambon-Bonavita MA (2003) Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**:23-30.
- Zbinden M, Le Bris N, Gaill F and Compere P (2004) Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **284**:237-251.
- Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, De Villardi de Montlaur C, Roussel E, Guyot F, *et al.* (2008) New insights in metabolic diversity among the epibiotic microbial communities of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **359**:131-140.
- Zhao XF, Wang JX. (2008) The antimicrobial peptides of shrimp immune response. *Invert Surviv J.* **5**:162e79.

Titles and legends to figures

Figure 1 – The full length nucleotide (above) and predicted amino acid (below) sequences of *Re*-crustin cDNA from *Rimicaris exoculata*. The start codon, stop codon and putative polyadenylation signal are in bold and underlined. The signal peptide is underlined. The predicted organization of WAP domain is shown in grey boxes. Twelve conserved cysteine residues are framed.

Figure 2 – Alignment and phylogenic analysis of *Re*-crustin. (A) *Re*-crustin was compared to the crustin sequences identified in Genbank. Alignment was performed using the Geneious[®] version 8.1 software. Black boxes are indicated similarity of amino acids sequences. The conserved cysteines are marked with asterisks. (B) The phylogenic tree deduced from the alignment of the crustin sequences obtained using Geneious[®] version 8.1 software using the Neighbor-Joining algorithm with the Kimura two-parameter correction matrix. The *Re*-crustin sequence is in red.

Figure 3 – *Re*-crustin distribution in adults of *Rimicaris exoculata* (A) Quantification of the levels of expression of *Re*-crustin in the gill chamber (branchiostegite; scaphognathite; gills) and in the digestive tract (gut, stomach, hepatopancreas) by real-time RT-PCR analysis using the $\Delta\Delta C_t$ method. The graphs show the mean $\pm$ S.E.M. of triplicate samples. (* $p < 0.05$; t-test). Reference (Rpl8) and target were amplified in separated wells ($n > 10$ in all cases). (B) Western blot analysis was performed using total protein extracts from 1: branchiostegite; 2: scaphognathite; 3: gills; 4: gut; 5: stomach and 6: hepatopancreas dissected from adults. Immunostaining with the anti-*Re*-crustin antibody revealed one band of approximately 17

kDa corresponding to *Re*-crustin mass prediction. Mw: molecular weight markers. Equivalent well loading was assessed by a generic proteic coloration of the gel (Coomassie blue).

Figure 4 – *Re*-crustin distribution along the *Rimicaris exoculata* life cycle and molt stages. Ajouter les photos qui illustrent le cycle de vie (A) Expression analysis by RT-qPCR. The graph shows the mean $\pm$ SEM of triplicate samples (*, $p < 0.05$; t test). Reference (Rpl8) and targets were amplified in separated wells ($n > 10$ in all cases). (B) Western blot analysis was performed using total protein extracts from 1: eggs; 2: juvenile; 3: adults (beginning of molt cycle); 4: adults (end of molt cycle). Immunostaining with the anti-*Re*-crustin antibody revealed one band of approximately 17 kDa corresponding to *Re*-crustin mass prediction. Mw: molecular weight markers. Equivalent well loading was assessed by a generic proteic staining of the gel (Coomassie blue).

Figure 5 – Relative expression level of the *Re*-crustin in *Rimicaris exoculata* after bacterial challenge (*Vibrio diabolicus* HE800) or archaeal challenge immersion and (*Pyrococcus abyssi* GY 855, *Methanococcoides vulcanii* SLH33) at 10^5 C/ml. "Sea immersion" corresponds to the control group for which no microbes were added to the water tank of the shrimps, "in situ" corresponds to the control group that was not repressurized. (A) Quantification of the levels of expression of *Re*-crustin. The graph show the mean $\pm$ SEM of triplicate samples (*, $p < 0.05$; t test). Reference (Rpl8) and targets were amplified in separated wells ($n > 10$ in all cases). (B) Western blot analysis was performed using total protein extracts from 1: control "sea immersion"; 2: bacterial immersion; 3: archaeal immersion. Immunostaining with the anti-*Re*-crustin antibody revealed one band of approximately 17 kDa corresponding to *Re*-crustin mass prediction. Mw: molecular weight markers. Equivalent well loading was assessed by a generic proteic staining of the gel (Coomassie blue).

gttcatcaccactgaaggacaaacacctcctcctccagctctctagattttctcaag -1

atgctgttattgtctttaatagctatagccaatttagctatggctttaccagaaaaggcc 60
M L L L S L I A I A N L A M A L P E K A 20
caggaaacccgccactatccaggacaaggaggcgtatttccaggacaaggaggcggattt 120
Q E T R H Y P G Q G G V F P G Q G G G F 40
cctggacaaggaggtggattccctggacaaggaggtggattccctggacaaggaggtgga 180
P G Q G G G F P G Q G G G F P G Q G G G 60
ttccctggacaaggaggtggattccctggacaaggaggcggatttccctggacaaggaggt 240
F P G Q G G G F P G Q G G G F P G Q G G 80
ggattccctggacaaggaggcggatttccctggacaaggaggtggattccctggaggatct 300
G F P G Q G G G F P G Q G G G F P G G S 100
tcctcttgtaaatactgggtgtagaacacctgaaaaccaagcctactgctgtgagaacggg 360
S S **C** K Y W **C** R T P E N Q A Y **C C** E N G 120
aaccagggtcaaagaccaacccctcgtcctaccatcaggcccgggatttgcccaccagtg 420
N Q A Q R P T P R P T I R P G I **C** P P V 140
cgaccgcagtgccccccaccagatttgaggaccccctcaaacatgttccagtgattct 480
R P Q **C** P P T R F G G P P Q T **C** S S D S 160
tcctgtaccaacaactatactgataaatgctgtttcgacagatgtcttgaagaacacgtc 540
S **C** T N N Y T D K **C C** F D R **C** L E E H V 180
tgcaaacacacctaacaataatttcggccgc**tga**aaatagtaagggaagtgaaatgaaggag 600
C K P P Q Q N F G R *** 190
gtgcgacgtaacacaggga**aattag**ccatgcatgttttgtgctaataagaaaaaaaaaaaaa 660
aaaaaaaaa 668

Figure 1

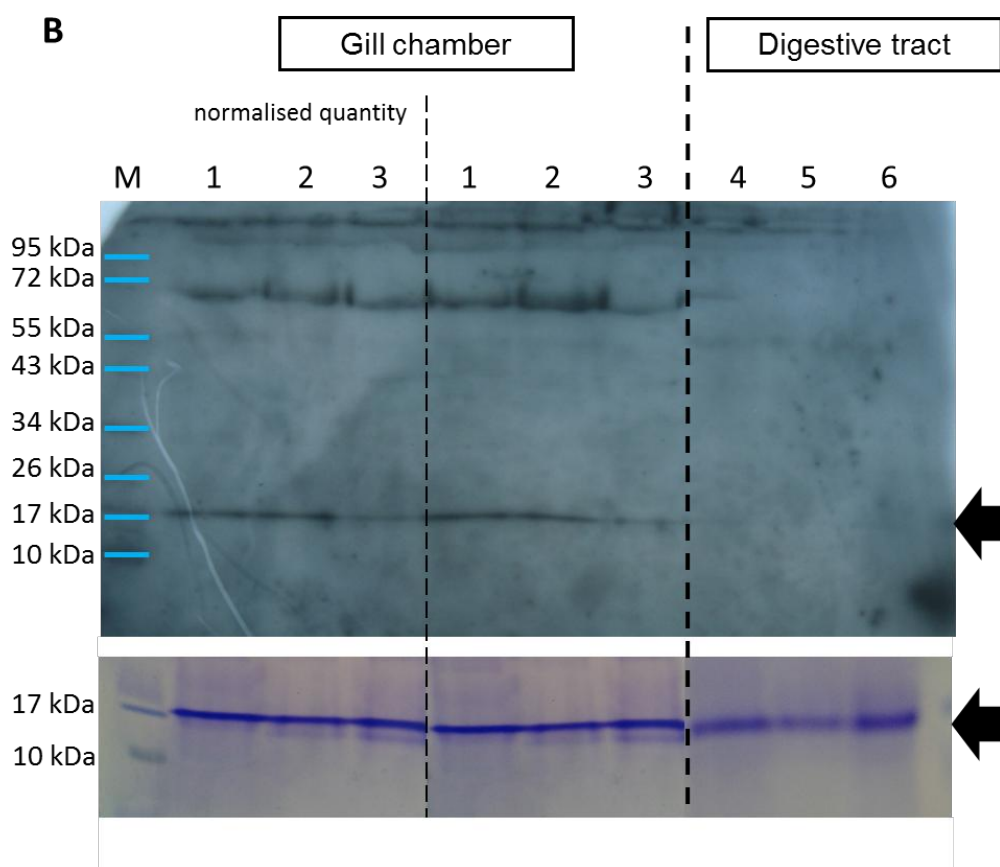
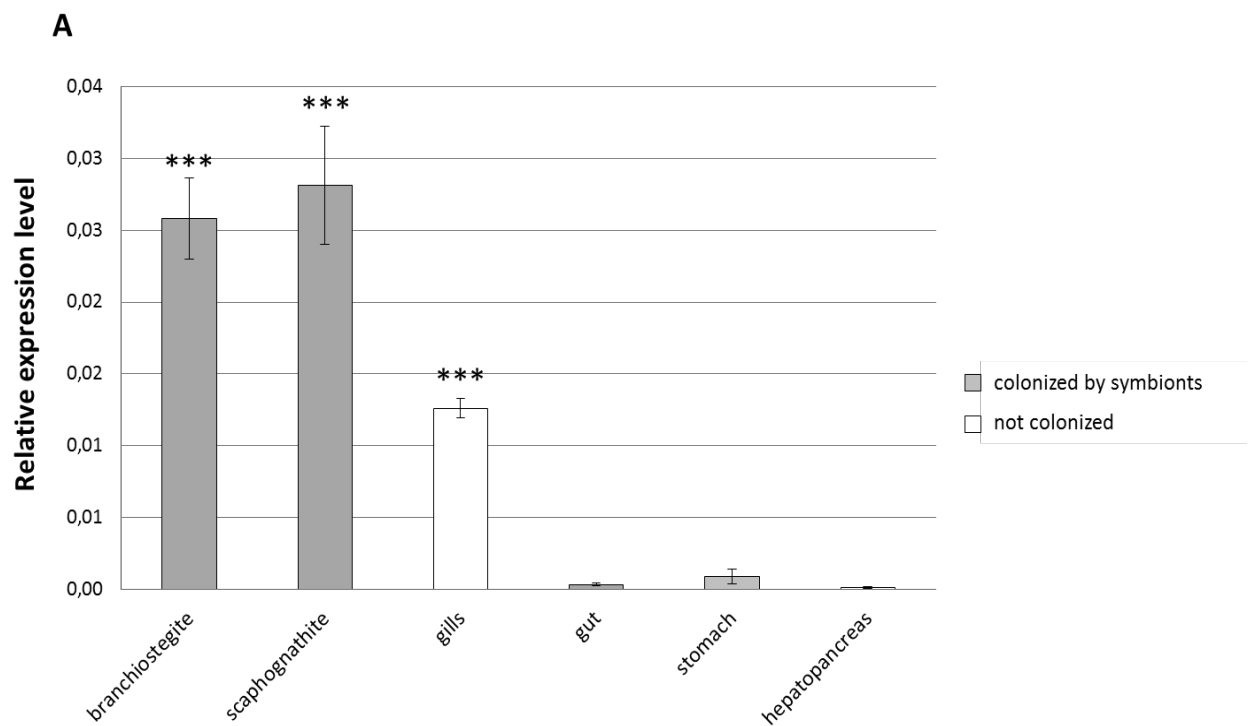


Figure 3

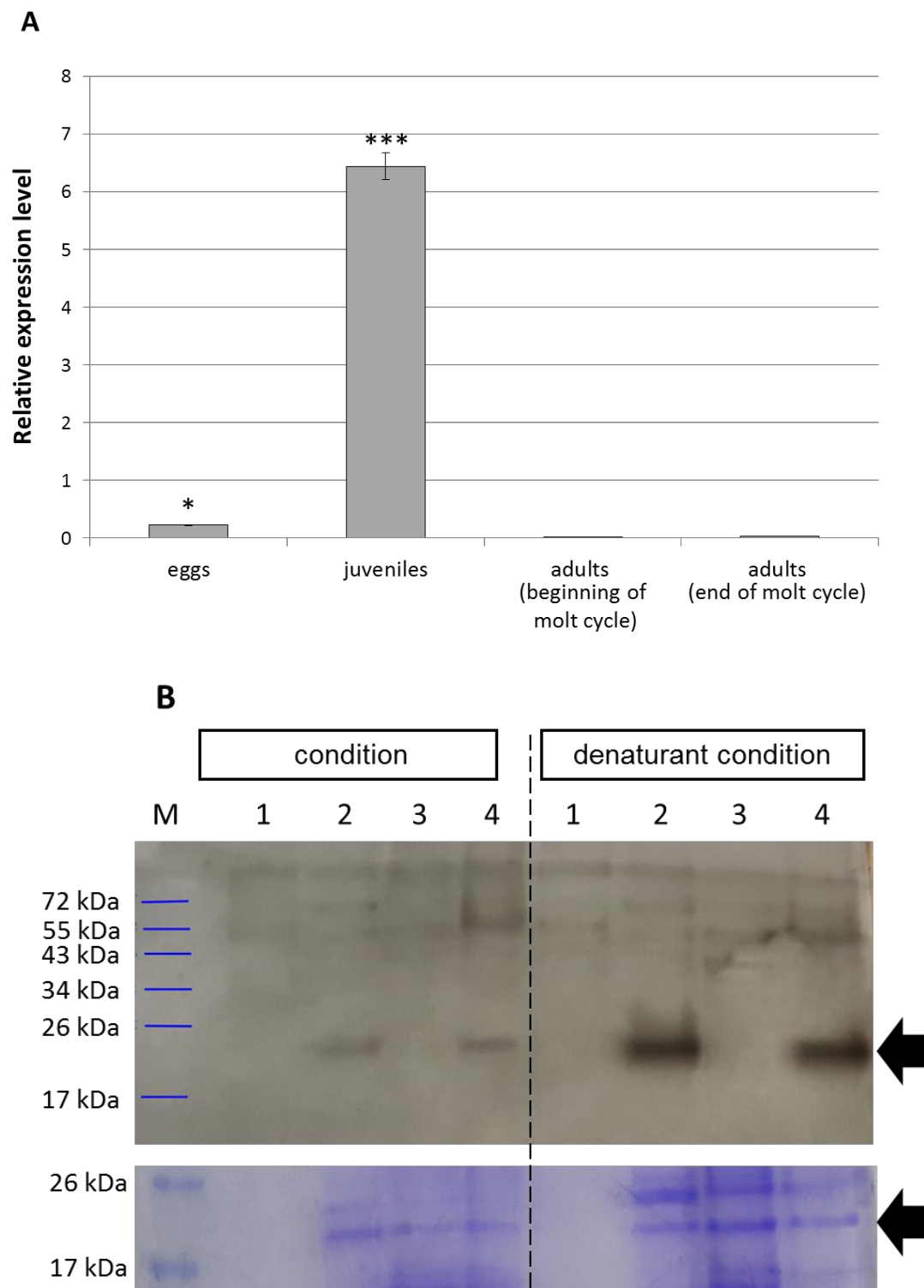


Figure 4

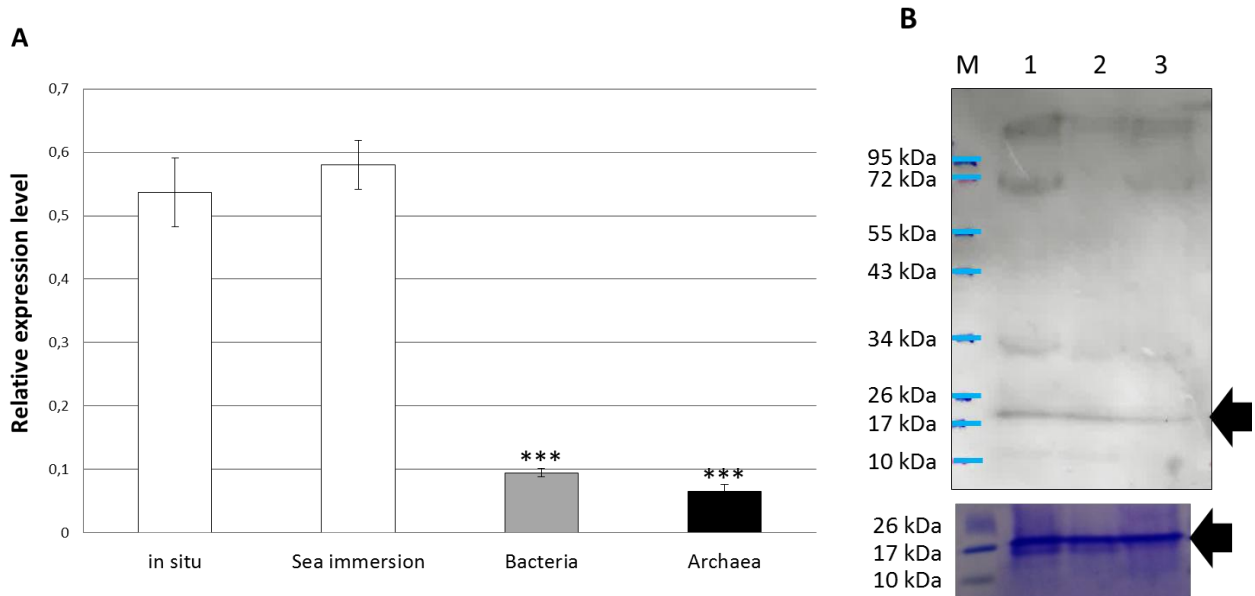


Figure 5

4. Principaux résultats de l'étude

Cette étude a permis pour la première fois la caractérisation complète chez une crevette hydrothermale, d'un peptide antimicrobien nommé Re-crustine (pour : *Rimicaris exoculata* crustine), qui présente 60-65 % d'identité avec les crustines déjà caractérisées chez les décapodes côtiers. La molécule présente les caractéristiques des crustines de type II à savoir, un peptide signal, une région riche en prolines suivie d'une région riche en cystéines puis un domaine C-terminal qui contient 8 résidus cystéines structurant un domaine WAP. L'ADNc contient un cadre ouvert de lecture de 698 bp codant pour une protéine putative de 190 résidus d'acides aminés. L'étude par RT-qPCR de l'expression du gène, révèle une expression basale dans les tissus en contact avec les symbiontes. Cette expression varie au cours des événements d'acquisition, de perte et de recolonisation des ectosymbiontes qui ponctuent la vie de *Rimicaris exoculata*, mais aussi au cours de son cycle de vie. Ces données, confortées par des expériences de Western blot, ajoutées à la présence d'un peptide signal qui atteste de la sécrétion du PAM dans le milieu extérieur, vont dans le sens d'une participation possible de la Re-crustine dans le contrôle de l'ectosymbiose et dans la réponse antimicrobienne de *Rimicaris*.

Les expériences de stimulations par balnéation avec des bactéries ou des archaea, ont montré que le taux d'expression de la *Re*-crustine diminuait. Ces résultats suggèrent que la *Re*-crustine ne semble pas induite en réponse à une stimulation avec des bactéries à Gram négatif ou avec des archaea. Cette absence d'induction peut s'expliquer par le fait que les crustines sont généralement actives contre les bactéries à Gram positif. Actuellement aucune étude n'a été conduite sur l'activité des crustines contre les archaea. L'absence d'induction pourrait être expliquée ici par le fait que la paroi des archaea étant différente de celle des bactéries, la crustine ne parviendrait pas à la déstabiliser afin de créer des pores. Son expression ne serait alors pas mise en œuvre en cas de contact avec ces lignées microbiennes et d'autres voies immunitaires sont sans doute à rechercher.

Afin de poursuivre la caractérisation de la *Re*-crustine, la protéine recombinante devra être exprimée permettant ainsi de déterminer sa structure par cristallographie et de réaliser des tests d'activité antimicrobienne afin de confirmer son rôle d'effecteur immunitaire de *R. exoculata*. Un effort d'échantillonnage des premiers stades larvaires est à effectuer afin d'étudier l'expression de la *Re*-crustine au cours du développement de *R. exoculata*. Enfin des études d'immuno-histochimies devront être réalisées afin de déterminer si la *Re*-crustine est préférentiellement sécrétée dans les tissus en contact avec les symbiontes.



Chapitre 5

Synthèse de l'étude



I. Synthèse de l'étude

La vie, le fonctionnement des écosystèmes, l'évolution sont régis par l'environnement et les interactions entre organismes vivants. Brièvement, ces interactions peuvent aller du négatif (parasitisme) au positif (symbiose), et vont, intrinsèquement, dans tous les cas, moduler la biologie des individus en présence. Les environnements hydrothermaux océaniques profonds présentent des conditions environnementales extrêmes de par les fortes pressions rencontrées, la présence de gradients physico-chimiques très contrastés, des composés chimiques réputés toxiques et une absence totale de lumière. Malgré tout, ces écosystèmes constituent de véritables « oasis de vie » contrastant avec le désert abyssal. La source primaire d'énergie dans ces environnements, pour les organismes vivants, provient de la chimiosynthèse microbienne. C'est pourquoi chez plusieurs espèces animales se sont mises en place des relations symbiotiques plus ou moins élaborées et évoluées, avec des partenaires microbiens permettant d'améliorer leurs valences écologiques dans ces environnements extrêmes, tels que le ver *Riftia pachyptila*, la modiole *Bathymodiolus azoricus* et également le modèle de cette étude, la crevette *Rimicaris exoculata*. Cette crevette ubiquitaire de nombreux sites hydrothermaux de la ride médio-Atlantique héberge deux communautés bactériennes ectosymbiotiques. La première, et la plus dense, est située dans son céphalothorax et la seconde est localisée dans son tube digestif.

Les approches et études entreprises au cours de mes travaux de thèse ont permis de compléter les études précédentes effectuées sur ces communautés afin de mieux comprendre les relations entre la crevette *Rimicaris exoculata* et ses symbiotes et entre les symbiotes eux-mêmes.

1. La communication hôte-symbiote

La communauté symbiotique du céphalothorax de *R. exoculata* est éliminée lors de chaque mue tous les dix jours. Ce cycle de mue est extrêmement court comparé à celui des crevettes côtières comme *Panaeus japonicus* (21 jours) ou encore *Macrobrachium rosenbergii* (41 à 91 jours). Pourtant, malgré la perte régulière de cette communauté, les symbiotes sont capables après chaque mue de recoloniser l'hôte toujours de manière identique et de façon localisée, suggérant un système de contrôle par l'hôte et une communication inter symbiotes.

Une étude réalisée en 2015 sur la colonisation de substrats inertes au niveau des cheminées hydrothermales et des sources froides (Szafranski et al., 2015), remet en cause la spécificité de l'association symbiotique entre *Rimicaris exoculata* et ses symbiotes, suggérant un "fooling" passif des bactéries lors de la colonisation du céphalothorax, au même titre que sur tout substrat disponible dans ces milieux. Cependant, cette hypothèse est basée sur des résultats acquis par la technique de pyroséquençage 454, qui utilise seulement une petite partie du gène ADNr 16S. Ceci, comme indiqué par les auteurs eux-mêmes, n'est pas suffisant pour une reconstruction phylogénétique, surtout avec des séquences ayant peu divergé. De plus, ces gènes partiels ont été récupérés à partir du site de Rainbow, où les crevettes *Rimicaris sp.* sont présentes. Mais aussi sur le site Menez Gwen (au-dessus de 1000 mètres de profondeur) où jamais aucune espèce de *Rimicaris* n'a été observée. Il est à noter que les biologistes s'accordent sur le fait que cette espèce est probablement limitée à des profondeurs supérieures à 2000 m de profondeur (Komai et Segonzac, 2008). Ainsi, il faut prendre en compte que dans ces études basées sur du séquençage 454, les séquences partielles peuvent en fait être affiliées à des espèces apparentées à des bactéries libres d'*Epsilonproteobacteria* proche du genre *Sulfivorium* et vivant dans le milieu hydrothermal (Sievert et al., 2008). Cette lignée est en effet, phylogénétiquement parlant, la plus proche parente cultivable des symbiotes de *R. exoculata* mais aussi de nombreuses autres espèces symbiotiques, tout océan confondu. Finalement, nous pouvons dire que les séquences retrouvées sont proches de la séquence d'ADNr 16S des symbiotes, mais elles ne permettent pas d'affirmer que ces bactéries correspondent aux symbiotes bactériens du céphalothorax eux-mêmes. En l'absence de culture il faudrait aller plus loin dans cette étude via des approches de métagénomique comparative par exemple. Ceci ne remet donc pas en cause l'étroite association entre *R. exoculata* et ses symbiotes du céphalothorax, démontrée par de nombreuses études précédentes.

En effet malgré ce renouvellement fréquent de la communauté symbiotique du céphalothorax, celle-ci est toujours identique quel que soit le site hydrothermal d'origine et l'hôte étudié (Petersen et al., 2010 ; Guri et al., 2012). Cette communauté est majoritairement composée de bactéries affiliées aux *Epsilonproteobacteria* (5 OTUs affiliées aux *Epsilonproteobacteria Sulfurovum*) et *Gammaproteobacteria* (2 lignées de *Gammaproteobacteria*). En outre, la diversité microbienne associée à *Rimicaris exoculata* est très réduite par rapport à celle de l'environnement (Flores et al., 2011). De plus, l'établissement de cette communauté ne se fait pas de manière anarchique. En effet, les communautés du céphalothorax sont toujours strictement localisées sur certaines pièces

buccales (une partie de la branchiostégite, scaphognathite), mais jamais retrouvées sur les branchies pourtant situées à proximité de celles-ci (Segonzac et al., 1993 ; Polz et Cavanaugh, 1995 ; Gebruk et al., 2000 ; Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a, 2008b ; Petersen et al., 2010 ; Hügler et al., 2011 ; Guri et al., 2012). Chez tous les spécimens observés à différents stades du cycle de mue, la colonisation commence par des bacilles allongés, qui se redressent, puis forment des filaments avant de se retrouver recouverts par des précipités minéraux provoquant des plages de lyses (Corbari et al., 2008). C'est lorsque cette couche minérale est complète que le phénomène d'exuviation prend place. De plus, l'étude du métagénome des symbiotes (Jan et al., 2014) a montré que les différentes lignées symbiotiques présentes dans le céphalothorax, possèdent des métabolismes similaires mais avec probablement des variations fines dans chacun d'entre eux, empêchant leur mise en compétition et permettant leur cohabitation à long terme sans phénomène de compétition/extinction. Des associations similaires, avec de multiples symbiotes sulfo-oxydants, ont été décrites chez les bivalves (Duperron et al., 2007, 2008 ; Raggi et al., 2013). Enfin le rôle trophique des symbiotes du céphalothorax a été montré en 2013 (Ponsard et al., 2013) permettant d'appuyer fortement le caractère mutualiste de cette association symbiotique. Enfin, en ce qui concerne le tractus digestif, la crevette présente des cellules microbiennes non séptées ayant franchi la barrière de la membrane péritrophique, chez tous les individus observés et présentant là aussi une diversité stable mais peu importante.

Tout ceci suggère donc un contrôle important en termes de localisation et de diversité de l'établissement de la communauté symbiotique par l'hôte et/ou entre les épibiontes eux-mêmes. Ainsi la formation de ce biofilm bactérien symbiotique du céphalothorax semble contrôlé, et ne peut être du simple "fooling" passif, d'autant que la carapace de la crevette n'est pas recouverte en partie externe (pourtant plus propice un fooling) et que la crevette dispose d'un système immunitaire pour prévenir une colonisation anarchique microbienne.

Nous pouvons donc supposer qu'une sélection ait lieu au cours des étapes de la colonisation, réalisée par l'hôte ou entre les épibiontes eux-mêmes. Cependant, le mode de contrôle de ces communautés par l'hôte et entre elles reste à ce jour inconnu. Lors de cette étude nous avons choisi d'examiner les mécanismes de communications participant à l'installation des biofilms bactériens dans la crevette. Mes travaux constituent ainsi la première étude du Quorum Sensing dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds. Mon étude a été réalisée en se basant sur les gènes *lux* identifiés dans le métagénome incomplet des épibiontes de *Rimicaris exoculata* (Jan et al., 2014). Elle a permis

de mettre en évidence la présence et l'expression de gènes *lux* dans la communauté épibiontique de *R. exoculata* à différents stades de la mue et de vie pour les sites hydrothermaux Rainbow, TAG, Snake Pit et Logatchev, suggérant une potentielle activité de QS. De plus, quel que soit le stade du cycle de vie (des œufs aux adultes), ou le stade du cycle de mue, les analyses phylogénétiques des gènes *luxS* et *luxR* ont mis en évidence un seul haplotype par site d'origine, suggérant la possible utilisation de ces gènes *lux*, plus divergents que les gènes ribosomiaux 16S, comme marqueurs biogéographiques pour tenter de retracer l'origine des individus d'un site hydrothermal ou entre les sites.

D'un point de vue fonctionnel, le gène *luxR* analysé dans cette étude pourrait coder pour un récepteur LuxR solo très similaire aux récepteurs LuxR à AHL, mais qui ne possède pas de protéine LuxI productrice d'AHL associée (Fuqua, 2006, Subramoni et Venturi, 2009, González et Venturi, 2013). L'absence de gène *luxI* dans le métagénome partiel et l'absence de molécules de type AHL dans les extraits analysés par LC-MS, conforte ainsi notre hypothèse que le récepteur LuxR soit de type solo. Ce récepteur pourrait donc fixer des AHLs produites par d'autres bactéries de la communauté épibiontique, ou des composés produits par la crevette pendant la colonisation. D'autre part, notre étude *in silico* a permis de montrer que le gène *luxS* code une protéine LuxS fonctionnelle. La colonisation du céphalothorax de *R. exoculata* par la communauté épibiontique après chaque mue pourrait donc être médiée par le signal AI-2 et plusieurs protéines de types LuxR solo capables à la fois d'intercepter ce signal de QS et des composés émis par l'hôte. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait compléter le métagénome des communautés symbiotiques de *R. exoculata* afin de rechercher la présence d'autres gènes *luxS* et leurs récepteurs affiliés LuxP, LuxM, mais aussi de gènes *luxI* producteur d'AHLs et leurs récepteurs LuxR affiliés. En l'absence de gène *luxI*, la présence de nombreux gènes *luxR* conforterait l'hypothèse des LuxR solos capables de jouer le rôle d'intermédiaire entre l'hôte *R. exoculata* et ses symbiotes bactériens.

2. L'immunité chez la crevette *Rimicaris exoculata*

Les deux communautés symbiotiques sont très localisées chez la crevette *R. exoculata*. En effet la communauté du céphalothorax est strictement limitée à certaines pièces buccales (branchiostégite interne supérieure et scaphognathite) mais jamais retrouvées sur les branchies situées aussi dans le céphalothorax (Segonzac et al., 1993 ; Polz et Cavanaugh, 1995 ; Gebruk et al., 2000 ; Zbinden et al., 2004, 2008 ; Corbari et al., 2008a, 2008b ; Petersen et al., 2010 ; Hügler et al., 2011 ; Guri et al., 2012). De même, les filaments bactériens non septés de la

communauté de tractus digestif sont insérés entre les microvillosités des cellules épithéliales (Durand et al., 2010). Ceci suggère un important contrôle de ces communautés par l'hôte, contrôle probablement réalisé grâce à son système immunitaire, qui pour la première fois a été étudié lors de nos travaux

Actuellement, un seul peptide antimicrobien a été identifié au niveau des systèmes hydrothermaux océaniques profonds, chez le ver hydrothermal *Alvinella pompejana* (Tasiemski et al., 2014). Mon étude a permis d'identifier un second peptide antimicrobien abyssal et le premier peptide antimicrobien chez la crevette *R. exoculata*. Ce peptide antimicrobien est une crustine nommée *Re*-crustine (pour *R. exoculata* crustine). Son cDNA contient un cadre ouvert de lecture de 698 pb codant pour un peptide de 190 acides aminés. Le domaine C-terminal contient 8 résidus cystéines structurant un domaine WAP retrouvé dans les carcinines et les crustines de plusieurs crustacés, qui montrent une activité antimicrobienne. Le peptide mature possède un poids moléculaire de 17.82 kDa et un point isoélectrique (pI) estimé à 8.49. La séquence en acides aminés montre que cette crustine appartient à la famille des crustines de type II. Cette crustine est particulièrement bien conservée par rapport aux crustines des espèces côtières, contrairement à l'alvinellacine, également impliquée dans le contrôle de la symbiose chez *Alvinella pompejana*. La comparaison de ces deux peptides permettrait de mieux comprendre les pressions de sélection biotiques et/ou abiotiques des peptides antimicrobiens hydrothermaux. Le niveau d'expression relatif des transcrits de la *Re*-crustine ainsi que celui du peptide sécrété a été mesuré dans différents tissus. Les premiers résultats montrent que la *Re*-crustine est exprimée dans tous les tissus étudiés, colonisés ou non par les symbiotes, mais que son expression est plus importante dans les tissus du céphalothorax dans lequel se trouve la communauté symbiotique la plus abondante et soumise au cycle de mue. L'analyse du niveau d'expression de cette crustine après des stimulations par balnéation avec une bactérie à Gram négatif ainsi qu'avec des archaea, suggère que ce peptide ne semble pas inductible par ce type de microorganismes. Enfin la *Re*-crustine semble exprimée dès les premiers stades de vie (œufs) jusqu'au stade adulte. Le niveau d'expression semble augmenter lors des premiers stades larvaires jusqu'à atteindre un pic d'expression au stade juvénile, puis diminue lors de l'acquisition du morphotype adulte. Ce changement d'expression fait écho au shift des communautés symbiotiques du céphalothorax qui a lieu entre les premiers stades de vie (œufs), dominés par les symbiotes *Gammaproteobacteria* et les stades post juvéniles dominées par les symbiotes *Epsilonproteobacteria*. Tout ceci semble indiquer que la *Re*-crustine joue un rôle dans le système immunitaire de *R. exoculata* et pourrait être impliquée

dans l'acquisition des symbiotes chez *Rimicaris exoculata* au cours de son cycle de vie et son cycle de mue, à l'instar de ce qui est observé chez les insectes.

Afin de poursuivre la caractérisation de la *Re*-crustine, la protéine recombinante devra être exprimée permettant ainsi de déterminer sa structure par cristallographie et de réaliser des tests d'activité antimicrobienne afin de confirmer son rôle d'effecteur immunitaire chez *R. exoculata*. Un effort d'échantillonnage des premiers stades larvaires est à effectuer afin d'étudier l'expression de la *Re*-crustine au cours du développement de *R. exoculata*. Enfin des études d'immuno-histochimies devront être réalisées afin de déterminer si la *Re*-crustine est préférentiellement sécrétée dans les tissus en contact avec les symbiotes.

II. Discussion et perspectives sur notre modèle d'étude

1. *Rimicaris exoculata* et ses symbiotes : une possible communication interrègne

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'activité d'un récepteur de type LuxR solos ainsi qu'un enzyme synthase LuxS producteur d'un auto-inducteur de type II qui permet la communication bactérienne inter-espèces. L'absence de gènes *luxI* dans le métagénome incomplet, et le fait que notre étude n'ait pu mettre en évidence de molécule de type AHL, nous laissent supposer que la communication bactérienne pourrait s'effectuer grâce à d'autres molécules de type AHL ou d'autres molécules restant encore à identifier.

Les bactéries peuvent moduler leur comportement en libérant et en répondant à la l'accumulation de molécules de signalisation. Cette coordination de la population, appelée Quorum Sensing (QS), est très répandue chez les bactéries à Gram-négatives. Les principaux acteurs du QS sont le producteur du signal, ou synthase de type LuxI ou LuxS, et un régulateur de transcription apparenté de type LuxR, qui répond aux molécules signal accumulées. Avec l'augmentation du nombre de séquences génomiques de bactéries et l'amélioration de la compréhension du fonctionnement du QS, de plus en plus de gènes codant pour des régulateurs de transcription homologues aux LuxR supplémentaires, habituellement en plus grand nombre que la synthase, ont été identifiés. La plupart de ces régulateurs supplémentaires sont appelés régulateurs LuxR "solos", parce qu'ils ne sont pas directement associés à une synthase dans leur génome correspondant. Beaucoup de

Proteobacteria possèdent des récepteurs LuxR solos. Ces récepteurs sont présents chez des bactéries capables de synthétiser des AHLs (ex : QscR chez *Pseudomonas aeruginosa*) ou incapables de les synthétiser (ex : SdiA chez *Escherichia coli*), mais qui sont malgré tout capables de capter des AHLs produites par d'autres bactéries. De plus, certains de ces récepteurs peuvent capter des molécules autres que les AHLs telles que l' α -pyrone, la dialkylresorcinols, trouvées chez des espèces pathogènes d'insectes du genre *Photorhabdus* (Brachman et al., 2013 ; Brameyer et al., 2015) ou bien d'autres types d'AHLs appelées aryl-homosérine lactones (Ahlgren et al., 2011). Cependant, la molécule signal capable d'être perçue par la majorité de ces récepteurs LuxR solos reste encore inconnue. Ces récepteurs sont donc des candidats potentiels pour la captation d'un nombre important de molécules de communication bactériennes.

Ces régulateurs pourraient donc répondre aussi à des stimuli environnementaux externes et être impliqués dans les communications interrègnes (Hughes et Sperandio, 2008). Les procaryotes et les eucaryotes ont coexisté et co-évolué pendant des millions d'années, au cours desquelles ils ont été exposés aux molécules de signalisation produites et libérées par l'autre. Les scientifiques sont en train de découvrir que ces deux royaumes communiquent également par l'intermédiaire de molécules de signalisation. Il semblerait que les hôtes eucaryotes soient impliqués dans l'amélioration ou la perturbation des systèmes de communication bactériens, et que de manière similaire, les molécules de communication bactériennes puissent influencer l'expression des gènes eucaryotes (cf Introduction, section I.1.4). L'existence d'une communication interrègne est prévisible, mais la spécificité du ligand et les fonctions qui sont réglementées sont propres à chaque circuit de signalisation. *In fine* cela peut conduire soit à la colonisation microbienne réussie de l'hôte, soit à une réponse de la défense de l'hôte. Plusieurs études ont montré que les auto-inducteurs bactériens (AHL) sont en effet capables de moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Telford et al., 1998 ; Smith et al., 2002 ; Mota et Cornelis, 2005 ; Ziemmermann et al., 2006 ; Holm et Vikström, 2014). Le fait que ces LuxR solos soient maintenus dans le génome après leur acquisition, et efficacement intégrés dans les systèmes de régulation bactériens, offre sans doute une contribution avantageuse et un avantage concurrentiel aux bactéries porteuses de ces régulateurs.

Ainsi, notre modèle symbiotique *R. exoculata*, pourrait reposer sur un système de communication où les bactéries possèderaient un nombre important de récepteurs de type LuxR solos aux domaines d'attachement (SBD) variés, leur permettant à la fois de capter les

molécules de communication, de types AHL ou non, produites par les symbiotes, et à la fois de capter des molécules de types hormones produites par l'hôte, ou même de nouvelles molécules restants encore à identifier. D'autre part, les symbiotes bactériens pourraient être capables de produire des auto-inducteurs, capables de réguler la réponse immunitaire de *R. exoculata* favorisant ainsi leur installation localisée. Les LuxR solos joueraient ainsi le rôle de "téléopérateurs" dans la communication hôte/symbiotes et entre les symbiotes eux-mêmes. Dans un même temps, les potentielles molécules de communication produites par les bactéries pourraient moduler le système immunitaire de l'hôte afin de permettre la colonisation des symbiotes (Figure 57).

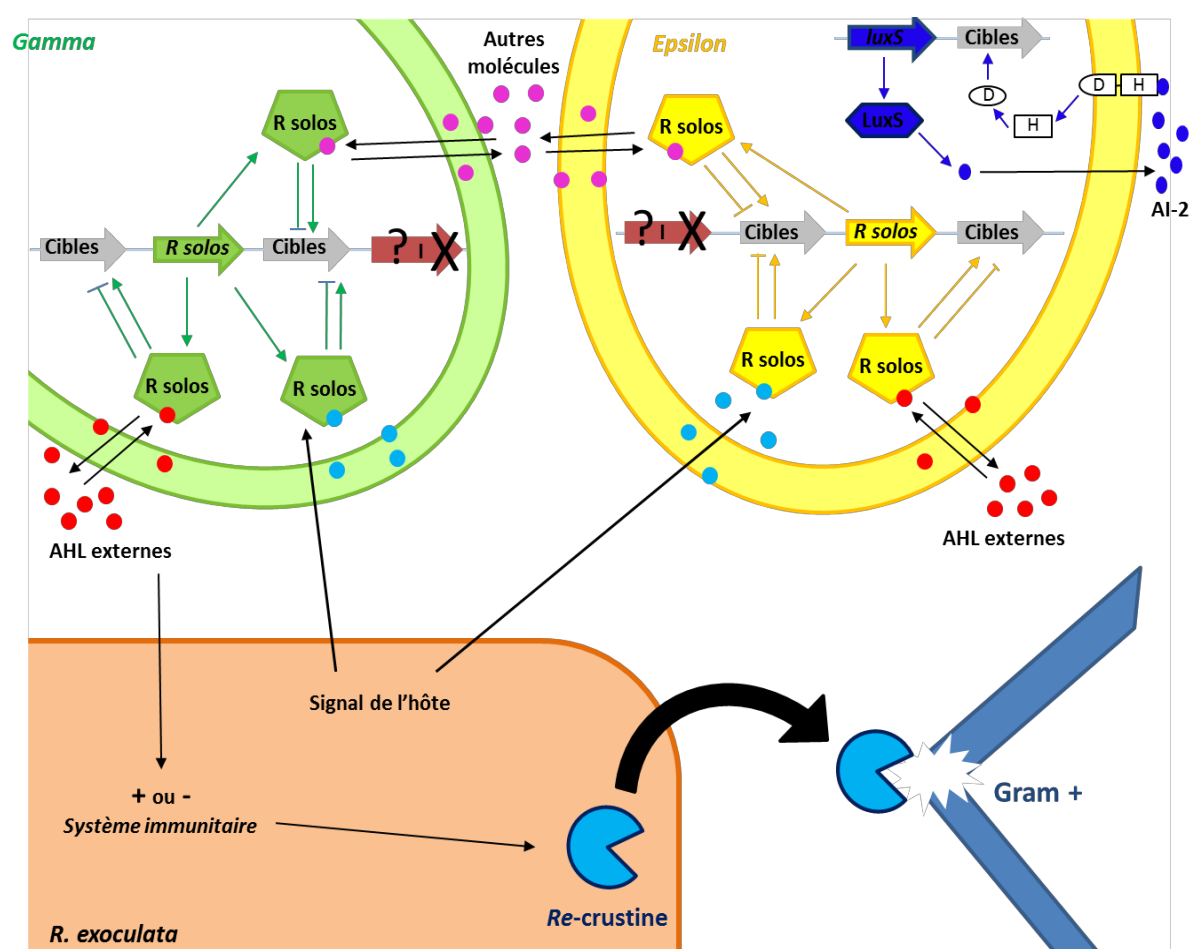


Figure 55 : Proposition d'un modèle de communication globale de la communauté symbiotique du céphalothorax chez *Rimicaris exoculata*.

Afin de compléter les voies de communication du QS chez les symbiotes, et de confirmer le système de communication proposé ici, il est nécessaire de compléter le métagénome des symbiotes. Ceci permettrait de rechercher la présence d'autres gènes du QS tel que les synthèses d'AHL LuxI et leurs récepteurs LuxR associés, mais aussi d'autres synthèses de

type LuxS et ses récepteurs associés. Une fois identifiés, ces gènes pourraient être amplifiés et exprimés dans des vecteurs d'expression, afin de pouvoir produire en grande quantité les potentielles molécules de communication produites à partir de ces gènes pour les caractériser par spectrométrie de masse et étudier leurs activités lors d'expérimentations *in vivo*.

Décrypter les différents langages de communication ayant lieu entre les hôtes et les bactéries est susceptible d'être un défi majeur pour la recherche future, en raison des nombreuses et différentes associations et/ou interactions ayant lieu dans la nature.

2. Des ectosymbiotes sous contrôle

De nombreux travaux restent à réaliser afin de compléter la caractérisation du peptide antimicrobien *Re*-crustine chez *R. exoculata*, initiée lors de cette thèse.

Tout d'abord l'analyse phylogénétique et la structure de cDNA ont montré que la *Re*-crustine était une crustine de type II. De futurs travaux devront être entrepris afin de déterminer la structure génomique de la *Re*-crustine. L'obtention de la séquence génétique entière permettrait de prédire les sites d'attachement des facteurs de transcriptions du système immunitaire comme les NF-kB ou des facteurs de transcriptions heat-shock. Ceci nous permettra de comprendre les mécanismes de son expression. Ces prédictions pourraient également permettre d'orienter nos choix sur les facteurs de stress induisant l'expression de la *Re*-crustine lors des tests de balnéations en aquarium pressurisé. Enfin, la détermination de la structure génétique permettrait de comparer la séquence de la *Re*-crustine à celle des crevettes côtières et de discuter de leurs relations évolutives.

La communauté symbiotique du céphalothorax est strictement limitée à certaines pièces buccales. Les expériences de PCR quantitatives et de Western blot montrent que le taux de *Re*-crustine est plus élevé dans ces pièces buccales que dans les branchies, pourtant elle aussi situées dans le céphalothorax. Ceci suggère que la *Re*-crustine pourrait participer d'une part à empêcher la colonisation d'autres bactéries sur les pièces buccales colonisées (Figure 55), et d'autre part que la *Re*-crustine pourrait faire partie d'un cocktail de peptides antimicrobiens sécrétés par *R. exoculata* afin de limiter l'expansion de la communauté symbiotique et empêcher la colonisation des branchies. La restriction de ses symbiotes trophiques (Ponsard et al., 2013) sur certaines pièces buccales du céphalothorax pourrait être alors considérée comme une sorte de "domestication ectosymbiotique". Pour confirmer ces hypothèses, des expériences d'immunohistochimies pourraient être réalisées afin de détecter si la *Re*-crustine

est sécrétée dans les tissus et les cellules en contact avec les ectosymbiotes (Tasiemski et al., 2014) (Figure 58). Cette méthode nous permettrait d'autre part de suivre la localisation de la *Re*-crustine au cours de l'ontogenèse et du développement de la crevette.

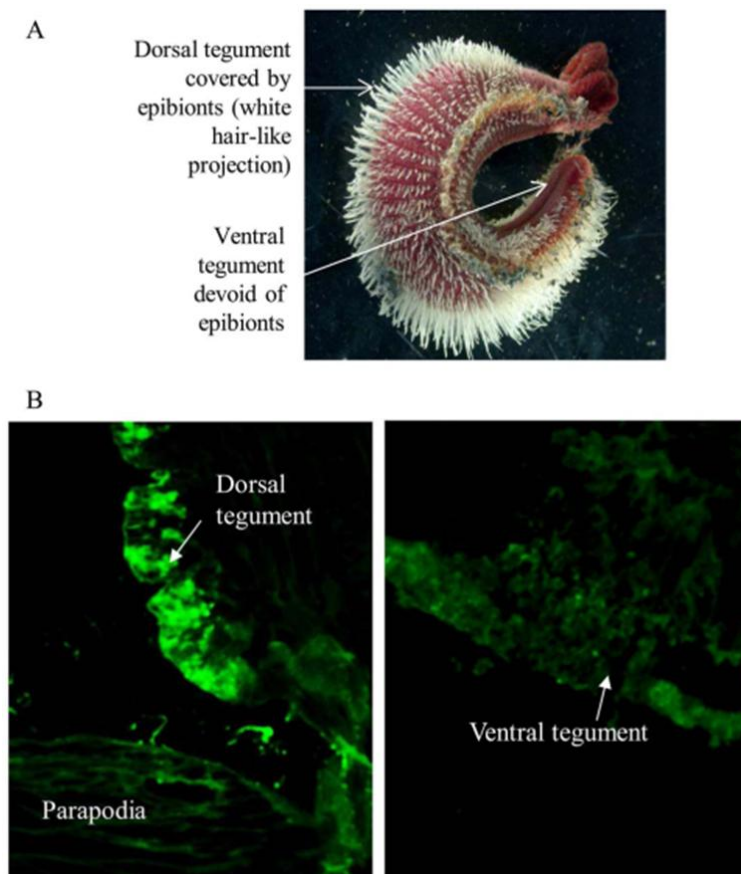


Figure 56 : Production de l'alvinallacine dans les tissus en contact avec les symbiotes (Tasiemski et al., 2014). (A) Photo d'*Alvinella pompejana* montrant la distribution des ectosymbiotes. (B) Données d'immunohistochimie montrant l'accumulation de l'alvinellacine dans les tissus colonisés par les symbiotes (présent sur le dos, absent sur le ventre).

D'autre part des tests d'activité antimicrobiens devront être réalisés avec la protéine recombinante de la *Re*-crustine afin de confirmer son activité antimicrobienne et déterminer son spectre d'activité. Ceci nécessitera l'expression de la *Re*-crustine dans un vecteur recombinant, afin d'obtenir une production du peptide recombinant pur. La protéine recombinante n'étant pas disponible actuellement, des tests de gels "overlay" (Steinberg et Lehrer, 1997) sont en cours pour tenter de démontrer cette activité antimicrobienne.

Le cycle de mue est extrêmement court (10 jours) et pourrait participer au concept de "trade-off" symbiotique explicité chez les insectes (Masson et al., 2016). Dans ce concept l'hôte offre "le gîte et le couvert" au symbiote tant qu'il peut se reposer sur

l'approvisionnement métabolique de celui-ci. Toutefois, lorsque le coût du maintien des symbiotes devient plus coûteux pour l'hôte que l'apport métabolique fourni par les symbiotes, les symbiotes sont recyclés par des processus cellulaires tels que l'autophagie et l'apoptose ("trade off"). Ainsi, le céphalothorax hypertrophié de la crevette *R. exoculata* offre un environnement protecteur pour les symbiotes contre les conditions hydrothermales très fluctuantes (Van Dover 2000), et les symbiotes fournissent des éléments nutritifs par l'intermédiaire d'un transfert transcuticulaire (Ponsard et al., 2013). Pendant le cycle de mue, la croissance de ces symbiotes est accompagnée d'une accumulation de minéraux progressive (Corbari et al., 2008), causée en partie par les activités des symbiotes (Jan et al., 2014). En stade pré-ecdysial avancé, la croûte minérale entoure complètement les symbiotes. Ceci pourrait "étouffer" les symbiotes qui ne seraient plus en mesure de nourrir l'hôte. L'hôte peut alors déclencher sa mue afin de recycler ses ectosymbiotes. Ce concept de "trade-off" symbiotique grâce au cycle de mue chez notre modèle *Rimicaris exocultata* laisse à penser qu'au cours de son évolution future, les pièces anatomiques du céphalothorax colonisées par les symbiotes pourraient être, à terme, enfermées dans une seule cavité distincte de celle des branchies, constituant ainsi de véritables "chambre de culture bactérienne".

Les symbiotes du tactus digestif de *R. exoculata* sont présents sous la formes de long filaments fins, non septés, insérés entre les microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal. Le charançon du genre *Sitophilus* est capable de contrôler ses symbiotes à l'intérieur des bactériocytes à l'aide d'un PAM : la coleopteracin A ou ColA (Login et al., 2011 ; Login and Heddi, 2013). La ColA inhibe la cytodierèse des symbiotes sans altérer leur métabolisme, permettant à ces derniers de continuer à fournir des nutriments à l'hôte. C'est le concept de "domestication endosymbiotique". Il existe donc probablement une "domestication ectosymbiotique" de la communauté symbiotique du tractus digestif de *R. exoculata* à l'aide d'un PAM similaire à la ColA du charançon *Sitophilus*.

Pour conclure, il serait intéressant de rechercher les autres peptides antimicrobiens présents chez *R. exoculata*. Pour cela l'obtention du méta-transcriptome de cette crevette permettrait d'identifier dans un premier temps les séquences codantes de ces peptides, et dans un second temps, de les caractériser selon les mêmes méthodes proposées pour la caractérisation de la *Re*-crustine. D'autres par, l'utilisation de banques d'hybridation soustractives, après avoir soumis les crevettes à un stress avec des bactéries non symbiotiques

ou des archaea, permettrait probablement de trouver de nouveaux types de peptides spécifiques des écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds.

III. Conclusion

La vie, le fonctionnement des écosystèmes, l'évolution sont régis par l'environnement et les interactions entre organismes vivants. Brièvement, ces interactions peuvent aller du négatif (parasitisme) au positif (symbiose), et vont, intrinsèquement, dans tous les cas, moduler la biologie des individus mis en jeu et leur évolution. Notre modèle, la crevette *Rimicaris exoculata*, vivant dans les écosystèmes que sont les sources hydrothermales océaniques, considérées comme reflétant les possibles origines de la vie sur Terre, entretient une relation symbiotique étroite avec deux communautés d'épibiontes lui permettant de s'adapter et de vivre dans de tels environnements. Les animaux peuvent être considérés comme des super-organismes symbiotiques, composés de cellules eucaryotes et de résidents microbiens qui réalisent des fonctions essentielles pour leur hôte. A chaque acquisition des symbiontes, les hôtes et les symbiontes doivent relever à chaque génération et chaque mue le même défi : comment l'association correcte et bénéfique peut-elle être réitérée, et comment les relations nuisibles et inutiles peuvent être écartées. Pendant la colonisation des tissus animaux, la communication entre les bactéries colonisatrices et l'hôte régule les processus chez les deux organismes, influençant le résultat de l'interaction. Le système immunitaire inné de l'hôte détecte les produits bactériens et joue un rôle majeur dans le contrôle et la sélection des espèces bactériennes symbiotiques qui colonisent des niches spécifiques. Les bactéries quant à elles, libèrent des produits qui modulent la réponse de l'hôte et produisent des protéines de signalisation qui réagissent à l'interface avec l'hôte. Les différentes études menées sur le sujet incluant les travaux de cette thèse montrent que *R. exoculata* s'inscrit dans ces processus d'interactions symbiotiques complexes.



Annexes





Annexe 1

Mise en place d'une étude d'éco-toxicologie pour la faune hydrothermale océanique profonde et ses symbiontes grâce au modèle *Rimicaris exoculata*.



1. Introduction de l'étude

À la lumière du développement de l'industrie minière en haute mer, particulièrement intéressées par les dépôts de sulfures massifs, riches en métaux ayant une valeur commerciale importante, les efforts se multiplient pour mieux comprendre l'impact environnemental potentiel des extractions minières sur la faune locale. La possibilité d'une exposition de la faune hydrothermale aux métaux est donc à étudier, d'où la nécessité d'explorer davantage la toxicité des produits chimiques liés à l'exploitation en haute mer. Pour cela, il est nécessaire d'adapter les protocoles d'éco-toxicologiques mis en place en eaux peu profondes aux conditions de haute mer, afin de permettre une réelle compréhension de l'impact anthropique potentiel sur la faune profonde (Mestre et al. 2014). Le site hydrothermal TAG situé sur la dorsale médio-Atlantique possède des fluides chauds, riches en divers métaux, y compris en cuivre, avec des concentrations comprises entre 120 et 150 μm (Edmonds et al., 1996). Le cuivre est un oligo-élément essentiel qui se trouve dans une variété de cellules et de tissus et utilisé comme cofacteur de plusieurs enzymes. Comme les invertébrés possèdent la capacité de concentrer certains métaux du milieu environnant, reflétant ainsi leur variation (Blanc et Rainbow 1985), ils sont de bons outils pour surveiller les changements des concentrations de métal à la suite d'activités anthropiques. Ainsi, la crevette *Rimicaris exoculata* est un bon modèle d'étude car c'est l'une des espèces hydrothermales les plus étudiées et donc les mieux connue (e.g. Van Dover et al. 1988 ; Rieley et al. 1999 ; Allen et al. 2001 ; Ravaux et al. 2003 ; Zbinden et al. 2004, 2008 ; Corbari et al. 2008 ; Schmidt et al. 2008; Cottin et al. 2010).

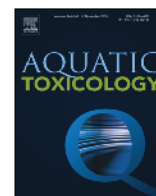
Le but de cette étude était d'évaluer les niveaux naturels de biomarqueurs au sein de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* et ses réponses à l'exposition au cuivre à pression *in situ* (30 MPa), ainsi que les effets de la dépressurisation et la pressurisation à l'aide de l'aquarium à haute pression IPOCAMP. Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet MIDAS visant à évaluer l'impact anthropique d'une exploitation minière sur les systèmes hydrothermaux océaniques profonds.

2. Méthode expérimentale

Les crevettes *R. exoculata* ont été prélevées sur les parois de la cheminée hydrothermale du site TAG (Mid Atlantic Ridge) à 3630 m de profondeur au cours de la campagne BICOSE en 2014. L'accumulation des métaux dans les tissus a été quantifiée dans différents tissus (branchies, hépatopancréas et musculaires) et plusieurs biomarqueurs ont été mesurés: l'exposition métallique (métallothionéines ou MTs), le stress oxydatif (la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion-S-transférase et la glutathion peroxydase) et les dommages oxydatifs (peroxydation lipidique). Pour cela les niveaux de réponse de biomarqueurs (MTs, enzymes antioxydantes et LPO, enzyme de la peroxydation des lipides) sont évalués dans différents tissus (branchies, hépatopancréas et abdomen) chez des *Rimicaris exoculata* exposées au cuivre (0,4 pm et 4 µM) à la pression et à la température *in situ* (30 MPa, 10°C) pendant 72h. L'accumulation des métaux (Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Cd) est comparée au niveau de références des biomarqueurs en conditions naturelles (échantillonnage isobarique) et après incubation à haute pression (pas d'exposition en métal, Shillito et al. 2001, 2014).

3. Article :

Mise en place d'une étude d'éco-toxicologie pour la faune hydrothermale océanique profonde et ses symbiontes grâce au modèle *Rimicaris exoculata*.



Development of an ecotoxicological protocol for the deep-sea fauna using the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*



M. Auguste^a, N.C. Mestre^{a,*}, T.L. Rocha^a, C. Cardoso^a, V. Cueff-Gauchard^{b,c,d},
S. Le Bloa^{b,c,d}, M.A. Cambon-Bonavita^{b,c,d}, B. Shillito^e, M. Zbinden^e, J. Ravaux^e,
M.J. Bebianno^a

^a CIMA, Faculty of Science and Technology, University of Algarve, Campus de Gambelas, 8005 139 Faro, Portugal

^b Ifremer Centre Bretagne, REM/EEP/Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, Ifremer, UBO, CNRS, ZI Pointe du Diable, CS10070, 29280 Plouzané, France

^c UBO, UMR 6197, UBO, Ifremer, CNRS, IUEM Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France

^d CNRS, UMR 6197, CNRS, Ifremer, UBO, IUEM Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France

^e Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, UMR CNRS 7208, MNHN/IRD-207/UCN/UA, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques, 7 Quai St. Bernard, 75252 Cedex 5 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2015

Received in revised form 24 March 2016

Accepted 29 March 2016

Available online 30 March 2016

Keywords:

Deep-sea mining
Hydrothermal vents
Biomarkers
Ipocamp
Copper
TAG

ABSTRACT

In light of deep-sea mining industry development, particularly interested in massive-sulphide deposits enriched in metals with high commercial value, efforts are increasing to better understand potential environmental impacts to local fauna. The aim of this study was to assess the natural background levels of biomarkers in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* and their responses to copper exposure at *in situ* pressure (30 MPa) as well as the effects of depressurization and pressurization of the high-pressure aquarium IPOCAMP. *R. exoculata* were collected from the chimney walls of the hydrothermal vent site TAG (Mid Atlantic Ridge) at 3630 m depth during the BICOSE cruise in 2014. Tissue metal accumulation was quantified in different tissues (gills, hepatopancreas and muscle) and a battery of biomarkers was measured: metal exposure (metallothioneins), oxidative stress (catalase, superoxide dismutase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase) and oxidative damage (lipid peroxidation). Data show a higher concentration of Cu in the hepatopancreas and a slight increase in the gills after incubations (for both exposed groups). Significant induction of metallothioneins was observed in the gills of shrimps exposed to 4 µM of Cu compared to the control group. Moreover, activities of enzymes were detected for the *in situ* group, showing a background protection against metal toxicity. Results suggest that the proposed method, including a physiologically critical step of pressurizing and depressurizing the test chamber to enable the seawater exchange during exposure to contaminants, is not affecting metal accumulation and biomarkers response and may prove a useful method to assess toxicity of contaminants in deep-sea species.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Hydrothermal vents are massive sulphide deposits with high concentration of various metals (e.g. Cu, Ni, Zn, Mn, Co, Ag, Au) with potential economic interest to mining industries (Hannington et al., 2011). Recently, the Government of Papua New Guinea has given exploration license to Nautilus Minerals Corporation to explore this

type of mineral deposits in the Manus basin (Gena, 2013). However, it is likely that the impact of human activities will somehow change the natural equilibrium of this particular environment (Van Dover, 2014). The living fauna will likely be exposed to variations in environmental metal composition, hence the need to further explore the toxicity of chemicals associated with deep-sea exploitation. For this it is considered essential to adapt the existing ecotoxicological protocols from shallow-water to the deep-sea conditions to enable a better understanding of potential anthropogenic impact on deep-sea fauna (Mestre et al., 2014).

* Corresponding author.

E-mail addresses: neliamestre@gmail.com, ncmestre@ualg.pt (N.C. Mestre).

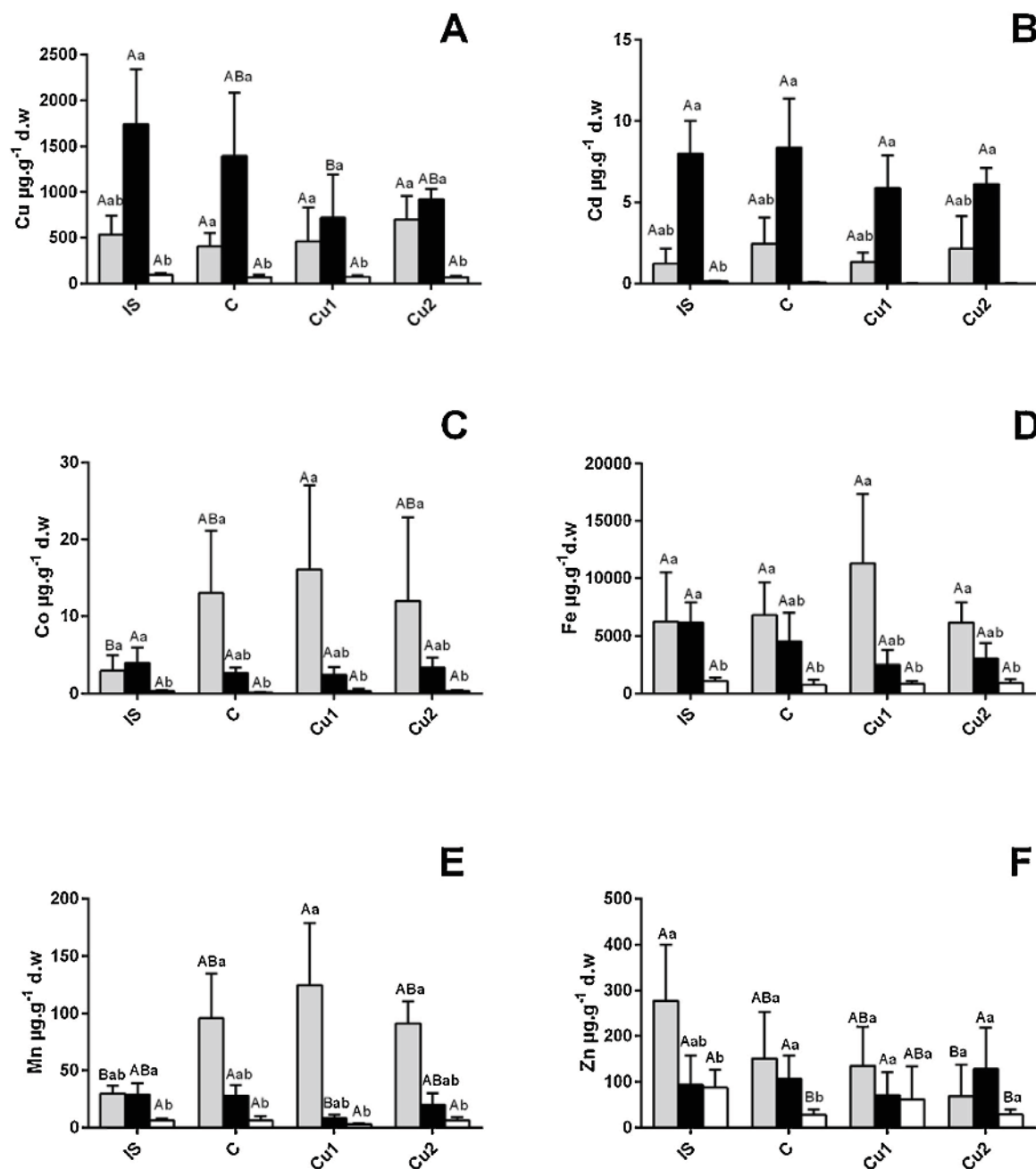


Fig. 1. Metals concentrations (mean $\pm$ SD) in tissues of *Rimicaris exoculata* for the different treatments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$) with capital letters for comparison of one tissue between groups and lowercase letters for comparison among one group. Gills (grey), hepatopancreas (black), abdominal muscle (white), IS: *in situ* group, C: control, Cu1: exposed to 0.4 μ M, Cu2: exposed to 4 μ M.

The Trans-Atlantic Geotraverse (TAG) hydrothermal vent field is located on the Mid-Atlantic Ridge and its hot fluids are rich in various metals, including copper with concentrations ranging between 120 and 150 μ M (Edmonds et al., 1996). Copper is an essential trace element found in a variety of cells and tissues and used as cofactor of several enzymes. However, free Cu ions (Cu^+ and Cu^{2+}) can participate in the formation of reactive oxygen species (ROS) (Gaetke and Chow, 2003). As invertebrates possess the ability to concentrate certain metals from the surrounding medium, reflecting the variation in metal concentration in the environment (White and Rainbow, 1985), they are useful tools to monitor change of metal amounts as a result of anthropogenic activities.

Increasing total dissolved metal concentration will lead to a higher metal uptake rate (Rainbow, 1998). To prevent the increase

of metal accumulation in cells, organisms possess defence mechanisms such as specific proteins which play a role in binding metals, as for example the metallothioneins (MTs). These cysteine-rich non-enzymatic proteins are vital for various biological functions like storage, transport, compartmentalization of essential and non-essential metals (detoxification mechanisms) and can also act as oxyradicals scavengers protecting cells against ROS (Roesijadi, 1992). In the presence of certain metals and/or high-metals concentrations, ROS formation will induce an antioxidant defence mechanism. This mechanism consists in the action of specific enzymatic proteins, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST). These enzymes will limit the ROS levels and prevent oxidative damage (Di Giulio et al., 1995). Nevertheless, if the action of these

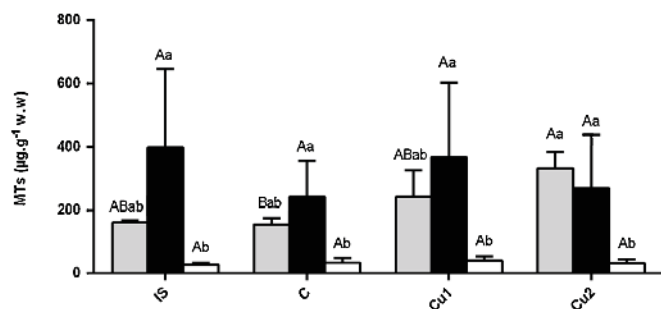


Fig. 2. Metallothioneins (MTs, mean $\pm$ SD) in tissues of *Rimicaris exoculata* for the different treatments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$) with capital letters for comparison of one tissue between groups and lowercase letters for comparison among one group. Gills (grey), hepatopancreas (black), abdominal muscle (white), IS: *in situ* group, C: control, Cu1: exposed to $0.4 \mu\text{M}$, Cu2: exposed to $4 \mu\text{M}$.

enzymes is not sufficient, the free radicals will reach the cellular membranes and cause oxidative damage, such as lipid peroxidation (LPO), which is the oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs; Halliwell and Gutteridge, 1984).

Previous studies have already looked into metal accumulation and antioxidant responses in the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen, Lucky Strike and Rainbow vent sites (Company et al., 2004, 2006a,b, 2007, 2008; Bebianno et al., 2005). A few studies have looked into metal accumulation (Kádár et al., 2006; Geret et al., 2002), antioxidant enzymes activities (Gonzalez-Rey et al., 2008), MTs and oxidative damage (Geret et al., 2002; Gonzalez-Rey et al., 2007) in the vent shrimp *Rimicaris exoculata*. Nevertheless, only one study has investigated the toxicity of metal exposure under laboratory controlled deep-sea conditions of high pressure and low temperature (Company et al., 2006a) using one of the few available equipment that enable these kind of studies, the IPOCAMP (Incubateur Pressurisé pour l'Observation et la Culture d'Animaux Marins Profonds; Shillito et al., 2014).

The chimney walls at TAG are covered by dense swarms ($1200\text{--}3000 \text{ indiv m}^{-2}$) of the vent shrimp *R. exoculata*, also known to be one of the most abundant invertebrate species in the Mid-Atlantic Ridge (Desbruyères et al., 2000; Schmidt et al., 2008). *R. exoculata* is also one of the most studied deep-sea species, making it a good model for investigating deep-sea environmental changes (e.g. Van Dover et al., 1988; Gebruk et al., 1993; Vereshchaka, 1997; Rieley et al., 1999; Allen et al., 2001; Geret et al., 2002; Ravaux et al., 2003; Zbinden et al., 2004, 2008; Copley et al., 2007; Gonzalez-Rey et al., 2007, 2008; Anderson et al., 2008; Corbari et al., 2008; Schmidt et al., 2008, 2009; Cottin et al., 2010; Ponsard et al., 2013; Jan et al., 2014).

Elutriate toxicity tests with weathered vent chimney material were conducted during the environmental impact studies at Solwara 1, Papua New Guinea. The concentration of Cu released after 30 min in the field-based elutriate tests was $15\text{--}20 \mu\text{g L}^{-1}$ and in the laboratory-based tests was $38\text{--}140 \mu\text{g L}^{-1}$ (Simpson et al., 2008). The selected copper concentrations used in the present study reflect these results.

This study assesses the biomarkers (MTs, antioxidant enzymes and LPO) response in different tissues (gills, hepatopancreas and abdominal muscle) in *R. exoculata* exposed to $0.4 \mu\text{M}$ ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) and $4 \mu\text{M}$ ($254 \mu\text{g L}^{-1}$) of copper at *in situ* pressure and temperature (30 MPa , 10°C). It also compares the metal accumulation (Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Cd) and biomarkers baseline levels under natural conditions (isobaric sampling) and after maintenance in a high-pressure aquarium IPOCAMP (no metal exposure). Finally, this study also compares the effects of depressurization and pressurization of the

test chamber (conditions necessary for the Cu enriched seawater and oxygen renewal during the test).

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

R. exoculata were sampled in February 2014 from the TAG vent field ($26^\circ 08.2' \text{ N}$, $44^\circ 49.5' \text{ W}$) in the Mid-Atlantic Ridge, during the oceanographic cruise BICOSE, aboard the research vessel *Pourquoi pas?* The organisms were collected using the slurp gun of the ROV VICTOR 6000 (IFREMER), and using the PERISCOP for isobaric and isothermal recovery (Shillito et al., 2008). The shrimps were taken from the main black smoker on the wall near the main spire.

2.2. Cu exposure experiments

A total of 24 shrimps were used in this study, divided into 4 groups. The first group ($n = 6$) called *in situ* (IS) was dissected under sterile conditions and flash frozen in liquid nitrogen straight after collection and stored at -80°C until further use. The other shrimps were directly transferred into the pressurized aquarium IPOCAMP for a Cu exposure experiment at 10°C . A copper solution was prepared using CuSO_4 (analytical grade, Sigma). Shrimps ($n = 6$ per condition) were isolated in 3.8 L boxes for: control (C; only seawater); $0.4 \mu\text{M}$ of Cu (Cu1); and $4 \mu\text{M}$ of Cu (Cu2). The experiment was carried out at 30 MPa and 10°C for 72 h. For seawater and oxygen renewal, the IPOCAMP was depressurized every 12 h, and the viability of the animals was checked. At the end of the exposure period (72 h), survival of the shrimp was 100%, although one of the animals of the Cu2 group appeared less responsive to stimulation. The tissues were dissected (gills, hepatopancreas and muscle; without gut or exoskeleton) and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analyses.

2.3. Tissue preparation

Tissues were individually homogenized at 4°C in a Tris-HCl (0.02 M , 5 mL g^{-1} soft tissue) buffer with butylated hydroxytoluene (BHT, $10 \mu\text{L mL}^{-1}$), pH 8.6. The homogenate (3 mL) was separated in soluble and insoluble fractions by centrifugation ($30,000g$, 45 min , 4°C) and the remaining homogenate was used for determination of metal concentrations. After centrifugation, a part of the supernatant was used for the measurement of LPO and total protein content. The other part of the supernatant was heat treated at 80°C for 10 min followed by a centrifugation ($30,000g$, 45 min , 4°C) to separate the low molecular weight proteins, and the supernatant was used for MT measurements.

For antioxidant enzyme analysis, tissues were individually homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing sucrose (250 mM), MgCl_2 (5 mM), DTT (1 mM). After 10 min of incubation, the homogenates were centrifuged at $1000g$ for 10 min at 4°C and the cytosolic fraction was kept for analysis.

2.4. Metal analysis

For metal concentration determination, homogenates were weighed, dried (80°C , 48 h) and submitted to wet acid digestion with 67% nitric acid in a hot plate (80°C , 2 h). Six metals (Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Cd) were analysed by graphite furnace absorption spectrometry (AAS, AAnalyst 800-PerkinElmer). Accuracy of the analytical method was checked by analysing certified reference material TORT-2 (NRC-CNRC) (lobster hepatopancreas), measured values ($99 \pm 17 \mu\text{g g}^{-1}$ Cu, $138 \pm 28 \text{ Fe}$, $124 \pm 52 \text{ Zn}$, $14 \pm 2 \text{ Mn}$, $0.49 \pm 0.08 \text{ Co}$, $33 \pm 3 \text{ Cd}$) were within the values of certified values in the reference material ($106 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$ Cu, $105 \pm 13 \text{ Fe}$, 180 ± 6

Zn, 13.6 ± 1.2 Mn, 0.51 ± 0.09 Co, 26.7 ± 0.6 Cd). Data expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry tissue weight (d.w.). The values for total soft tissues correspond to the sum of gills, hepatopancreas and muscle, taking into the account the contribution of the weight of each tissue.

2.5. Metallothioneins (MTs)

MTs were determined in the heat-stable supernatant by differential normal pulse polarography (Bebiano and Langston, 1989), using an Eco Chemie mAutolab III potentiostat and a Methrom 663VA stand with a static mercury drop electrode (SMDE) and GPES 4.9 software (Eco Chemie). In the absence of a shrimp MT standard, a rabbit MT standard was used. MTs levels are expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ of wet tissue weight (w.w.).

2.6. Total proteins

Total proteins were measured by the method of Bradford (1976) adapted to a microplate reader (Infinite® 200 PRO-Tecan), using Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich) as a standard. The proteins concentration is expressed as mg g^{-1} of wet tissue weight.

2.7. Antioxidant enzymes activities

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by measuring the reduction of cytochrome c by the xanthine oxidase/hypoxanthine system at 550 nm (McCord and Fridovich, 1969). One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits the reduction of cytochrome c by 50%. SOD activity is expressed in U mg^{-1} prot.

Catalase (CAT) activity was determined according to Greenwald (1985). The activity was determined as the decrease in absorbance during 1 min at 240 nm due to H_2O_2 consumption in buffer of monobasic and dibasic potassium, pH 7.5. CAT activity is expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ prot.

Glutathione peroxidation (GPx) activity was measured by following NADPH oxidation at 340 nm in the presence of excess glutathione reductase, reduced glutathione and corresponding peroxide (Flohe and Gunzler, 1984). The GPx activities were measured by using cumene hydroperoxide as substrate. GPx activity is expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ prot.

Glutathione-S-transferase (GST) activity was determined by following the conjugation of reduced glutathione (GSH) with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB; Habig et al., 1974). A buffer containing $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0.2 M), pH 7.9, was used. The change in absorbance was recorded at 340 nm for 1 min. The activity was calculated as nmol of CDNB formed per $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ prot (using a molar extinction coefficient of $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

2.8. Lipid peroxidation (LPO)

Oxidative damage was analysed in terms of LPO. Determination of malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4-HNE) concentration, both sub-products of polyunsaturated fatty acid peroxidation, was realized using the method described by Erdelmeier et al. (1998) and maximal absorbance at 586 nm. Malondialdehyde bis-(dimethyl acetal) (Sigma-Aldrich) was used as a standard. The LPO is expressed in nmol of MDA+4-HNE mg^{-1} prot.

2.9. Statistical analysis

The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to assess the significant differences between exposure groups and tissues for each variable (biomarkers and metals concentration). Results were significantly different when $p < 0.05$. Principal components analysis

Table 1
Metal concentration (mean $\pm$ SD) in tissues of *Rimicaris exoculata* and *Mirocaris fortunata*. Data expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. or $\mu\text{mol g}^{-1}$ w.w. G: Gill; H: hepatopancreas; M: abdominal muscle; S.T.: soft tissue.

Species	Sites	Tissues	Cu	Cd	Co	Fe	Mn	Zn	References
<i>Rimicaris exoculata</i>	TAG ($\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.)	G	535 ± 205	1.24 ± 0.91	3 ± 2	6201 ± 4299	26 ± 11	277 ± 123	This study
		H	1562 ± 592	8.32 ± 1.68	3.7 ± 1.7	6122 ± 1764	29 ± 10	94 ± 64	
	TAG ($\mu\text{mol g}^{-1}$ w.w.)	M	98 ± 23	0.15 ± 0.03	0.3 ± 0.1	1052 ± 307	6 ± 2	88 ± 39	This study
		S.T.	379 ± 146	1.3 ± 0.4	1.6 ± 0.3	2740 ± 1191	16 ± 3.5	112 ± 31	
		G	0.75 ± 0.18	$0.32 \times 10^{-3} \pm 0.1 \times 10^{-3}$	$3.1 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-4}$	3.6 ± 1.1	0.022 ± 0.004	0.22 ± 0.06	
		H	2.51 ± 0.78	$8.7 \times 10^{-3} \pm 2.1 \times 10^{-3}$	$5.6 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$	12.9 ± 2.6	0.06 ± 0.02	0.24 ± 0.09	
	Rainbow ($\mu\text{mol g}^{-1}$ w.w.)	M	0.11 ± 0.02	$0.1 \times 10^{-3} \pm 0.03 \times 10^{-3}$	$0.5 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-4}$	1.5 ± 0.4	0.008 ± 0.002	0.13 ± 0.02	Geret et al., 2002
		S.T.	0.32 ± 0.18	0.0008 ± 0.0003	0.002 ± 0.0016	2.8 ± 1.5	0.02 ± 0.01	0.13 ± 0.04	
		G	1.2 ± 0.6	$0.014 \pm 4 \times 10^{-3}$	-	25.5 ± 11.4	0.316 ± 0.18	17.9 ± 5.0	
		H	0.61 ± 0.21	$3.5 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-4}$	-	24.6 ± 1.8	0.076 ± 0.009	5.7 ± 1.7	
<i>Mirocaris fortunata</i>	Rainbow ($\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.)	M	0.26 ± 0.08	$1.1 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-4}$	-	3.1 ± 1.86	0.039 ± 0.026	1.5 ± 1.1	Kádár et al., 2006
		G	1060 ± 200	-	-	90460 ± 48600	-	2900 ± 400	
	Rainbow ($\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.)	H	700 ± 200	-	-	6640 ± 2230	-	800 ± 700	Gonzalez-Rey et al., 2008
		M	300 ± 160	-	-	610 ± 260	-	300 ± 100	
		S.T.	176.7 ± 74	0.49 ± 0.02	-	2122 ± 867	43.2 ± 10.4	209 ± 111	
		G	1700 ± 500	-	-	122970 ± 41600	-	4300 ± 800	
	Lucky Strike ($\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.)	H	400 ± 100	-	-	3010 ± 620	-	600 ± 100	Kádár et al., 2006
		M	200 ± 60	-	-	940 ± 240	-	200 ± 40	
		G	1400 ± 500	-	-	44170 ± 15320	-	1900 ± 800	
		H	500 ± 200	-	-	1870 ± 250	-	900 ± 600	
		M	40 ± 10	-	-	190 ± 80	-	60 ± 30	

(PCA) was used in the ordination method to evaluate the relationship between the different treatments and the analysed variables in the gills and the hepatopancreas.

3. Result and discussion

3.1. Metal accumulation

The baseline metals concentrations in *R. exoculata* collected from TAG for the different tissues are described in Table 1. In all tissues the metal concentration descending trend is the following $\text{Fe} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Mn}$. In the total soft tissues, gills and muscle Co is more abundant than Cd, and the opposite was noted in the hepatopancreas (Table 1). The TAG black smoker presents hot fluids rich in metals (Fe 5590 μM , Cu 120–150 μM , Zn 46 μM , Mn 680 μM , Co <2 μM , Cd 66 nM) what is reflected by the accumulation of these metals in *R. exoculata* tissues (Table 1). This is in agreement with previous studies, with the same species but from another Mid-Atlantic Ridge vent field – Rainbow (hot fluids metal contents: Fe 24000 μM , Cu 140 μM , Zn 160 μM , Mn 2250 μM , Co 13 μM , Cd 130 nM; Douville et al., 2002). At both sites, the concentration of metals in different tissues is coherent with the variation of metals in the hot fluids. Rainbow's hot fluid is much richer in iron than TAG's fluid and iron accumulation is higher in shrimp's gills from the Rainbow vent site (90460 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.; Kádár et al., 2006) when compared to those from TAG (6201 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.; Table 1).

Vent shrimps do show higher natural Cu concentration in their body (379 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.) than their coastal counterparts (~ 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.; White and Rainbow, 1985). In a review by Pourang et al. (2004), the distribution of trace elements on coastal shrimps were listed, and for Cu, gills always show higher Cu concentrations, followed by hepatopancreas and then muscle. Nevertheless, in the present study, the hepatopancreas showed higher Cu concentration, and this observation is different from other studies where gills presented the highest concentration for the same species (Kádár et al., 2006; Geret et al., 2002). However, the present results are consistent with other studies on vent crustaceans, such as the accumulation of trace metals in the crab *Bythograea thermydron* where the highest Cu levels were found in the hepatopancreas (Cosson and Vivier, 1997). The high amount of Cu present in the hepatopancreas can be explained by the presence of high amounts of haemocyanin, copper-sulphur containing granules and MTs. Haemocyanin is one of the main protein synthesized in this organ (could represent 50% of total protein synthesized; Viarengo and Nott, 1993).

For the copper exposure experiment, Cu concentrations in the tissues for the different treatments are shown in Fig. 1 (see also Table A.1 in Supplementary material). The results do not show significant differences between groups ($p > 0.05$), except for the zinc with higher concentrations in the gills (277 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.) and in the total soft tissues (112 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.) of the *in situ* group when compared to shrimps exposed to 4 μM of Cu (69 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. and 49 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w., respectively; $p < 0.05$). For the *in situ* group, the concentration of Co and Mn is similar in the hepatopancreas and gills, but in the groups incubated inside the IPOCAMP there is a higher concentration in the gills. Cd is mainly accumulated in the hepatopancreas (8.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.), when compared to the gills (1.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.) and the muscle (0.15 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.; Fig. 1). As the *in situ* group represents the baseline concentrations, these results suggest that after incubation inside the IPOCAMP, where only Cu was added but not the other metals, there is a redistribution of metals among the different tissues. As some of these are essential metals, these results suggest their potential use in other biological functions in the gills, or that their excess are further eliminated/regulated through the gills.

A high variability in Cu concentration among the shrimp replicates was noted (Fig. 1). Still, the Cu concentration in the hepatopancreas decreases in the groups exposed to Cu (Cu1: 440 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w., Cu2: 810 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.) when compared to the *in situ* and control groups (IS: 1500 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w., C: 1376 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.). On the other hand, a slight increase in Cu concentration is observed in the gills for the Cu exposed groups while a non-significant decrease in Cu present in the muscle is noticed ($p > 0.05$; Fig. 1). Although, there is no published copper concentration values for *R. exoculata* habitat at TAG, the present results observed for the hepatopancreas suggest an elimination process during the 72 h incubation. Crustaceans possess Cu sulphur granules in the hepatopancreas and these may play a role as a detoxification mechanism. In shrimps, copper and sulphur are accumulated in the epithelial cells of the hepatopancreas as insoluble granules, thus decreasing the potential toxic effect of Cu present in the cytoplasm of cells (Viarengo and Nott, 1993; Ahearn et al., 2004). Moreover, the total Cu amount for the two exposed groups do not show significant differences which is in favour of a potential regulation mechanism of metal metabolism by the shrimps. White and Rainbow (1982) found that *Palaemon elegans* are able to regulate body levels of copper up to a threshold exposure level, beyond which the metal is accumulated in direct proportion to external metal levels (up to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the coastal shrimp). This threshold would presumably be higher for vent shrimps as they are constantly bathed in seawater rich in metals. This regulation can result from a balance between accumulation and elimination rate.

3.2. Metallothioneins

The MTs levels increased in the gills of the Cu exposed groups when compared to control and IS, with significant differences between the control (155 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.) and Cu2 (332 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.; $p < 0.05$; Fig. 2). Higher amounts of MTs (400 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.) were observed in the hepatopancreas (Fig. 2) while the muscle had the lowest, but in both tissues no significant differences were observed between the different treatments ($p > 0.05$).

To our knowledge only two studies on MTs levels in *R. exoculata* were previously reported. The study by Geret et al. (2002) presents data of MTs per tissues for *R. exoculata* from the Rainbow hydrothermal vent field. The MT data obtained in the present study (gills: 161 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.; muscle: 27 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.; Fig. 2) are in the same order of magnitude as for *R. exoculata* from the Rainbow (gills: 255 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.; muscle: 72 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.; Geret et al., 2002). However, TAG shrimps have lower MT levels in the hepatopancreas (399 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.) than those from Rainbow (3012 $\mu\text{g g}^{-1}$ w.w.; Geret et al., 2002). The other study that investigated MTs levels analysed the soft tissues of *R. exoculata* and *Mirocaris fortunata* which do not allow a direct comparison with the present, per tissue, results (Gonzalez-Rey et al., 2008).

MTs are induced in response to the Cu exposure. The significant induction of MTs in the gills at higher Cu concentration (4 μM) when compared to the control group seems to follow the slight increase of Cu (Figs. 1 and 2). This is probably linked the role of MTs in the detoxification and/or storage of Cu. An antioxidant role for MTs was suggested in previous studies with the mussel *Mytilus galloprovincialis*, through oxyradical scavenging protecting both isolated cells and the entire organism from oxidative stress (Viarengo et al., 1999). In the hepatopancreas, MTs levels do not change between groups ($p > 0.05$). Different explanations may be proposed. First, Campana et al. (2015) suggest that in the shrimp *Pandalus montagui*, most of the Cu is accumulated in a metabolically available form and excretion occurs from this component, implying that Cu could be eliminated in a metabolically active form and so would not induce MTs response. On the other hand, MTs can be linked to Cd, which is mainly accumulated in the hepatopancreas

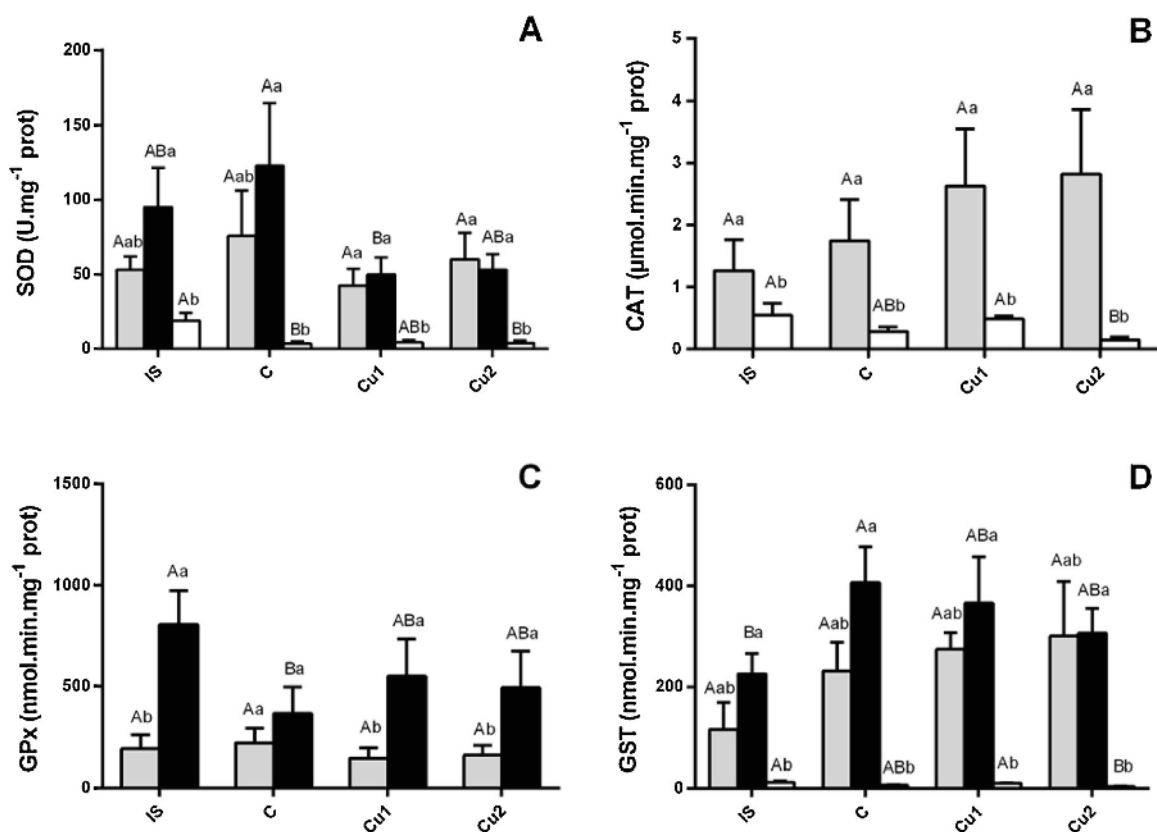


Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) activities (mean $\pm$ SD) in tissues of *Rimicaris exoculata* for the different treatments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$) with capital letters for comparison of one tissue between groups and lowercase letters for comparison among one group. Gill (grey), hepatopancreas (black), abdominal muscle (white); IS: *in situ* group, C: control, Cu1: exposed to 0.4 μ M, Cu2: exposed to 4 μ M. Given the small amount of tissue available for HP, CAT was not analysed. GPx activity was not detected in the abdominal muscle.

(Fig. 1) and whose amount does not vary after 72 h of incubation. The affinity of MTs with metals defines their binding abilities ($\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$; Engel and Brouwer, 1989). Cd is a non-essential metal, thus to avoid toxicity the organisms have to limit their accumulation or to complex the accumulated metal to a non- or less-toxic form (Depledge and Rainbow, 1990).

3.3. Antioxidant enzymatic response

The antioxidant enzymes activities show a tissue specific response and the separate analysis per tissue (not whole organism) is recommended for future studies, for higher resolution of the results. SOD activity is higher in the hepatopancreas with IS and C groups showing the highest values (IS: 95 $\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$; C: 123 $\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$; Fig. 3) and following the trend of Cu concentration (Table 1 and Fig. 1). This is in line with previous suggestions that the increase in cytosolic SOD activity is stimulated by higher Cu concentrations (Greco et al., 1990; Li et al., 2006). In the gills, no significant change was noted between the different treatments ($p > 0.05$). The highest GPx activity is observed in the hepatopancreas of the *in situ* group (706 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$; Fig. 3), which is significantly higher than in control (366 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$, $p < 0.05$).

Both CAT and GST activities follow a similar pattern (Fig. 3). An increasing trend of these enzymes activities in the gills follow the increasing Cu concentration (IS: 1.3 $\mu\text{mol CAT min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$, 116 $\mu\text{mol GST min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$; Cu2: 2.8 $\mu\text{mol CAT min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$, 301 $\mu\text{mol GST min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) but are not significantly different ($p > 0.05$). Increasing CAT activity with increasing Cu con-

centration has been previously observed (Li et al., 2006). Due to the low amount of tissue available, it was not possible to determine the CAT activity for the hepatopancreas. The GST activity in the hepatopancreas for the *in situ* group (225 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) was significantly lower when compared to the control group (406 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$, $p < 0.05$). Moreover, for the groups placed in the IPOCAMP, a slight downward trend in GST activity was observed with increasing Cu concentration. CAT and GST activities in the muscle were higher for the *in situ* and Cu1 groups, with Cu1 significantly higher than Cu2 for both enzymes ($p < 0.05$; Fig. 3). These enzyme activities detected in the tissues of shrimps suggest a protective mechanism against the presence of ROS, as previously noted by Gonzalez-Rey et al. (2008). In their study, they found that CAT in soft tissues of shallow-water shrimps as lower activity than in vents shrimps, while higher values of SOD and GPx activities were found in shallow-water shrimps (Gonzalez-Rey et al., 2008; Table 2). When comparing the enzyme activities in the hepatopancreas, shallow-water shrimps show lower activity for GPx (8.8 and 4.71 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ for *Palaemon serratus*; Oliveira et al., 2012; Silva et al., 2013) and GST (6.4 and 3.1 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ for *P. serratus*; Oliveira et al., 2012; Silva et al., 2013) when compared to *R. exoculata* (GPx: 804.2 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$, GST: 225.6 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$; Table 2). Similarly, *R. exoculata* presents higher values of CAT activity in the muscle (0.55 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) when compared to *P. elegans* (0.0053 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ for; Vinagre et al., 2014; Table 2). These observations are suggesting a detoxification strategy in this vent shrimp, adapted to an enriched metal extreme environment.

Table 2

Antioxidant enzymes activities (SOD, CAT, GPx, GST) (mean $\pm$ SD) in tissues of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and coastal shrimps *Palaemon elegans*, *Palaemon serratus*, *Palaemon varians*. G: Gills; H: hepatopancreas; M: abdominal muscle; S.T.: soft tissue.

Species		SOD (U mg ⁻¹ prot)	CAT (μ mol min mg ⁻¹ prot)	GPx (nmol min mg ⁻¹ prot)	GST (nmol min mg ⁻¹ prot)	References
<i>R. exoculata</i>	G	53.3 $\pm$ 8.8	1.3 $\pm$ 0.5	191.9 $\pm$ 68.8	116.3 $\pm$ 52.7	This study
	H	95.3 $\pm$ 26.2	–	804.2 $\pm$ 167.7	225.6 $\pm$ 40.8	
	M	19.2 $\pm$ 5.1	0.6 $\pm$ 0.2	–	12.5 $\pm$ 2.2	
	S.T	1.9 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.3	10 $\pm$ 1	–	
<i>P. elegans</i>	M	–	5.3 $\pm$ 0.3 ^a	–	0.56 $\pm$ 0.3	Gonzalez-Rey et al., 2008
	S.T	3.9 $\pm$ 1.3	1.2 $\pm$ 0.3	15 $\pm$ 3	–	Vinagre et al., 2014
<i>P. serratus</i>	M	–	0.7 $\pm$ 0.3 ^a	–	0.3 $\pm$ 0.1	Gonzalez-Rey et al., 2008
	H	–	1.5 $\pm$ 0.1	8.8 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.3	Vinagre et al., 2014
<i>P. varians</i>	H	–	1.5 $\pm$ 0.3 ^a	4.7 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.4	Silva et al., 2013
	S.T	4.4 $\pm$ 1.1	2 $\pm$ 0.4	22 $\pm$ 6	–	Oliveira et al., 2012
						Gonzalez-Rey et al., 2008

^a nmol min mg⁻¹ prot.

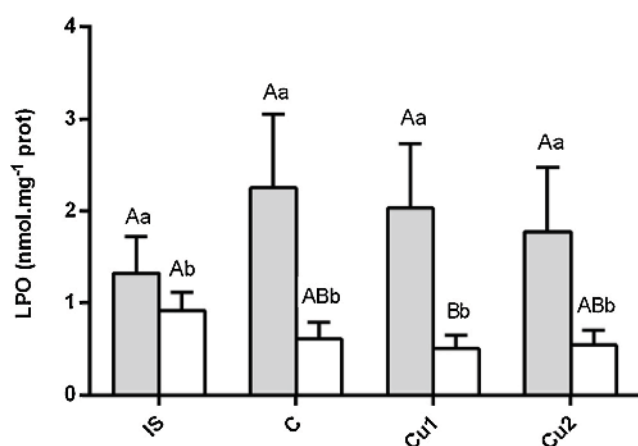


Fig. 4. Lipid peroxidation (LPO, mean $\pm$ SD) in tissues of *Rimicaris exoculata* for the different treatments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$) with capital letters for comparison of one tissue between groups and lowercase letters for comparison among one group. Gills (grey), hepatopancreas (black), abdominal muscle (white), IS: *in situ* group, C: control, Cu1: exposed to 0.4 μ M, Cu2: exposed to 4 μ M.

3.4. Oxidative damage

The LPO level in the gills of the *in situ* shrimps (1.3 nmol mg⁻¹ prot) was lower than in the other groups (Fig. 4). The control group shows higher damage (2.3 nmol mg⁻¹ protein) in the gills followed by a smooth decreasing trend of LPO levels with increasing Cu concentration (Cu1: 2 nmol mg⁻¹ prot, Cu2: 1.7 nmol mg⁻¹ prot), although no significant difference was found ($p > 0.05$). LPO in the muscle is similar for the two groups exposed to Cu (0.50 and 0.54 nmol mg⁻¹ prot for Cu1 and Cu2 respectively; $p > 0.05$) while in the *in situ* group it is more than 1.5-fold higher than in the exposed groups (IS and Cu1 $p < 0.05$). For the soft tissues of *R. exoculata*, from Rainbow vent, LPO was of the same order of magnitude (0.3 $\pm$ 0.05 nmol mg⁻¹ prot; Gonzalez-Rey et al. 2008). These results are 3-fold higher than that obtained for the coastal shrimps *P. elegans* and *P. varians*. (Gonzalez-Rey et al. 2008). Nevertheless, results suggest that Cu, at the exposure concentrations used in this study, is not inducing lipid peroxidation in *R. exoculata*.

3.5. Relationship between metal accumulation and biomarkers responses

The present results reinforce the fact that vent fauna, especially *R. exoculata*, have developed physiological adaptive strategies to face the metal-rich habitat they live in. Moreover, the establishment of protection through the antioxidant enzymes activities seems correlated with the decreasing trend of LPO levels in the gills. The activity of enzymes seems to have a beneficial effect in

decreasing the amount of ROS in cells and consequently limit the attack of ROS on membrane lipids. This result is in favour of a good detoxification process in the presence of copper. Nevertheless, the rather low impact of 4 μ M of Cu exposure on the shrimps might be due to the fact that they may have developed protective strategies as they are continuously bathed in a metal rich medium. Several studies have suggested the possibility of detoxification through the bacteria present in the gills chamber or in the gut (e.g. Jan et al., 2014). Part of the toxic compounds could be taken up by the bacteria hosted in the gills chamber of the shrimps and decreasing the amount of toxic compounds accumulated in shrimps tissues (Compère et al., 2002; Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003).

Given the small differences observed between the *in situ* and control groups for the variables assessed, the results suggest that the shrimps are apparently tolerant to the change of pressure (occurring during the water renewal) for at least the period of 72 h. The proposed protocol, including the pressurization and depressurization steps of the high-pressure aquarium for seawater renewal, seems to be an adequate method to assess toxicity to contaminants in deep-sea species. This may enable future longer term assays under high-pressure and low-temperature conditions, which will be more realistic from the perspective of potential deep-sea mining impacts. Nevertheless, future studies should attempt to increase the samples size and also look at the effects of other contaminants likely to be released during mining activities.

4. Conclusions

This study gives a first appraisal of the amounts of metals, MTs, antioxidant enzymes and LPO in different tissues of the vent shrimp *R. exoculata* from the TAG hydrothermal vent field. *R. exoculata* shows a background protection against metal toxicity as the activities of enzymes were detected for the *in situ* group. A tissue specific response was observed for the biomarkers analysed. Shrimps appear to develop protection against exposure to Cu, with increasing activity of antioxidant enzymes (CAT and GST) and induction of MT in the higher Cu concentration exposure (4 μ M). The ubiquity of the shrimp *R. exoculata* along the Mid-Atlantic Ridge and the similar responses observed in other vent sites (e.g. Rainbow) with those obtained in this study render this species as a good model for a possible monitoring of mining effects in hydrothermal vent fauna. Moreover, results suggest that the use of the pressurized aquarium do not affect the shrimps in terms of biomarkers responses to metal exposure. This method looks promising for further biomarkers responses studies with other deep-sea fauna.

Acknowledgements

This work was developed under the MIDAS project (Managing impacts of deep-sea resource exploitation), funded by the European

Commission 7th Framework Programme under the theme “Sustainable management of Europe’s deep sea and sub-seafloor resources” (Grant Agreement 603418). We thank the captain and the crew of the Pourquoi pas? Vessel and ROV Victor 6000 and the chief scientist of the BICOSE cruise. MA was supported by a MER MSc grant and the French mobility grants Idex and Aquimob.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.024>.

References

- Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J. Comp. Physiol. B* 174, 439–452.
- Allen, C.E., Copley, J.T., Tyler, P.A., 2001. Lipid partitioning in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 221, 241–253.
- Anderson, L., Halary, S., Lechaire, J.-P., Boudier, T., Frébourg, G., Marco, S., Zbinden, M., Gaill, F., 2008. Tomography of bacteria–mineral associations within the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *C.R. Chim.* 11, 268–280.
- Bebiano, M.J., Langston, W.J., 1989. Quantification of metallothioneins in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Portugaliae Electrochim. Acta* 7, 511–524.
- Bebiano, M.J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P., Fiala-Medioni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75, 354–373.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Campana, O., Taylor, A.M., Blasco, J., Maher, W.A., Simpson, S.L., 2015. Importance of subcellular metal partitioning and kinetics to predicting sublethal effects of copper in two deposit-feeding organisms. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1806–1814.
- Compère, P., Martinez, A.-S., Charmantier-Daures, M., Toullec, J.-Y., Goffinet, G., Gaill, F., 2002. Does sulphide detoxication occur in the gills of the hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*? *C.R. Biol.* 325, 591–596.
- Company, R., Serafim, A., Bebianno, M.J., Cosson, R., Shillito, B., Fiala-Medioni, A., 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 377–381.
- Company, R., Serafim, A., Cosson, R., Camus, L., Shillito, B., Fiala-Medioni, A., Bebianno, M.J., 2006a. The effect of cadmium on antioxidant responses and the susceptibility to oxidative stress in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar. Biol.* 148, 817–825.
- Company, R., Serafim, A., Cosson, R., Fiala-Medioni, A., Dixon, D., Bebianno, M.J., 2006b. Temporal variation in the antioxidant defence system and lipid peroxidation in the gills and mantle of hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Deep Sea Res. Part I: Oceanogr. Res. Pap.* 53, 1101–1116.
- Company, R., Serafim, A., Cosson, R., Fiala-Medioni, A., Dixon, D.R., Bebianno, M.J., 2007. Adaptation of the antioxidant defence system in hydrothermal-vent mussels (*Bathymodiolus azoricus*) transplanted between two Mid-Atlantic Ridge sites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28, 93–99.
- Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medioni, A., Camus, L., Colaco, A., Serrão-Santos, R., Bebianno, M.J., 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. *Sci. Total Environ.* 389, 407–417.
- Copley, J.T.P., Jørgensen, P.B.K., Sohn, R.A., 2007. Assessment of decadal-scale ecological change at a deep Mid-Atlantic hydrothermal vent and reproductive time-series in the shrimp *Rimicaris exoculata*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 87, 859–867.
- Corbari, L., Zbinden, M., Cambon-Bonavita, M., Gaill, F., Compère, P., 2008. Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquat. Biol.* 1, 225–238.
- Cosson, R., Vivier, J., 1997. Interactions of metallic elements and organisms within hydrothermal vents. *Cah. Biol. Mar.*, 43–50.
- Cottin, D., Shillito, B., Cheretemps, T., Tanguy, A., Léger, N., Ravaux, J., 2010. Identification of differentially expressed genes in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* exposed to heat stress. *Mar. Geosci. Res.* 3, 71–78.
- Depledge, M.H., Rainbow, P.S., 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Comp. Pharmacol.* 97, 1–7.
- Desbruyères, D., Almeida, A., Biscoito, M., Comtet, T., Kripounoff, A., Le Bris, N., Sarradin, P.-M., Segonzac, M., 2000. A review of the distribution of hydrothermal vent communities along the Northern Mid-Atlantic Ridge: dispersal vs environmental controls. *Hydrobiologia* 440, 201–216.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, 2nd ed. Taylor & Francis, Washington, pp. 523–561.
- Douville, E., Charlou, J.L., Oelkers, E.H., Bienvenu, P., Jove Colon, C.F., Donval, J.P., Fouquet, Y., Prieur, D., Appriou, P., 2002. The rainbow vent fluids (36° 14' N, MAR): the influence of ultramafic rocks and phase separation on trace metal content in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fluids. *Chem. Geol.* 184, 37–48.
- Edmonds, H.N., German, C.R., Green, D.R.H., Huh, Y., Gamo, T., Edmond, J.M., 1996. Continuation of the hydrothermal fluid chemistry time series at TAG, and the effects of ODP drilling. *Geophys. Res. Lett.* 23, 3487–3489.
- Engel, D., Brouwer, M., 1989. Metallothionein and metallothionein-like proteins. Physiological importance. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, vol. 5. Springer, Berlin, pp. 53–75 (Chapter 3).
- Erdelmeier, I., Gerard-Monnier, D., Yadan, J.C., Acudiere, J., 1998. Reactions of *N*-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals: mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1184–1194.
- Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–121.
- Gaetke, L.M., Chow, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147–163.
- Gebruk, A.V., Pimenov, N.V., Savvichev, A.S., 1993. Feeding specialization of bresiliid shrimps in the TAG site hydrothermal community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 98, 247–253.
- Gena, K., 2013. Deep sea mining of submarine hydrothermal deposits and its possible environmental impact in Manus Basin, Papua New Guinea. *Procedia Earth Planet. Sci.* 6, 226–233.
- Geret, F., Riso, R., Sarradin, P.-M., Caprais, J.-C., Cosson, R.P., 2002. Metal bioaccumulation and storage forms in the shrimp, *Rimicaris exoculata*, from the Rainbow hydrothermal field (Mid-Atlantic Ridge): preliminary approach to the fluid–organism relationship. *Cah. Biol. Mar.* 43, 43–52.
- Gonzalez-Rey, M., Serafim, A., Company, R., Bebianno, M.J., 2007. Adaptation to metal toxicity: a comparison of hydrothermal vent and coastal shrimps. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28, 100–107.
- Gonzalez-Rey, M., Serafim, A., Company, R., Gomes, T., Bebianno, M.J., 2008. Detoxification mechanisms in shrimp: comparative approach between hydrothermal vent fields and estuarine environments. *Mar. Environ. Res.* 66, 35–37.
- Greco, M.A., Hrab, D.I., Magner, W., Kosman, D.J., 1990. Cu, Zn superoxide dismutase and copper deprivation and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172, 317–325.
- Greenwald, R.A., 1985. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I.M., Jakoby, W.B., 1974. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 3879–3882.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14.
- Hannington, M., Jamieson, J., Monecke, T., Petersen, S., Beaulieu, S., 2011. The abundance of seafloor massive sulfide deposits. *Geology* 39, 1155–1158.
- Jan, C., Petersen, J., Werner, J., Huang, S., Teeling, H., Glöckner, F.O., Golyshina, O.V., Dubilier, N., Golyshin, P.N., Jebbar, M., Cambon-Bonavita, M.A., 2014. The gill chamber epibiosis of deep-sea *Rimicaris exoculata* shrimp revisited by metagenomics and discovery of zeta-proteobacterial epibionts. *Environ. Microbiol.* 16 (9), 2723–2738.
- Kádár, E., Costa, V., Santos, R.S., 2006. Distribution of micro-essential (Fe, Cu, Zn) and toxic (Hg) metals in tissues of two nutritionally distinct hydrothermal shrimps. *Sci. Total Environ.* 358, 143–150.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z., 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere* 62, 565–572.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Mestre, N.C., Calado, R., Soares, A.M.V.M., 2014. Exploitation of deep-sea resources: the urgent need to understand the role of high pressure in the toxicity of chemical pollutants to deep-sea organisms. *Environ. Pollut.* 185, 369–371.
- Oliveira, C., Almeida, J., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., Gravato, C., 2012. Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaeomonetes serratus*. *Aquat. Toxicol.* 124–125, 209–216.
- Ponsard, J., Cambon-Bonavita, M.A., Zbinden, M., Lepoint, G., Joassin, A., Corbari, L., Shillito, B., Durand, L., Cuffé-Gauchard, V., Compère, P., 2013. Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J.* 7, 96–109.
- Pourang, N., Dennis, J.H., Ghourchian, H., 2004. Tissue distribution and redistribution of trace elements in shrimp species with the emphasis on the roles of metallothionein. *Ecotoxicology* 13, 519–533.
- Rainbow, P.S., 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: Langston, W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, pp. 285–319.
- Ravaux, J., Gaill, F., Le Bris, N., Sarradin, P.-M., Jollivet, D., Shillito, B., 2003. Heat-shock response and temperature resistance in the deep-sea vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *J. Exp. Biol.* 206, 2345–2354.
- Rieley, G., Van Dover, C.L., Hedrick, D.B., Eglinton, G., 1999. Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance/stable isotope approach. *Mar. Biol.* 133, 495–499.

- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81–114.
- Schmidt, C., Le Bris, N., Gaill, F., 2008. Interactions of deep-sea vent invertebrates with their environment: the case of *Rimicaris exoculata*. *J. Shellfish Res.* 27, 79–90.
- Schmidt, C., Corbari, L., Gaill, F., Le Bris, N., 2009. Biotic and abiotic controls on iron oxyhydroxide formation in the gill chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Geobiology* 7, 454–464.
- Shillito, B., Hamel, G., Duchi, C., Cottin, D., Sarrazin, J., Sarradin, P.M., Ravaux, J., Gaill, F., 2008. Live capture of megafauna from 2300 m depth, using a newly-designed pressurised recovery device. *Deep Sea Res. I* 55, 881–889.
- Shillito, B., Gaill, F., Ravaux, J., 2014. The IPOCAMP pressure incubator for deep-sea fauna. *J. Mar. Sci. Technol.* 22, 97–102.
- Silva, C., Oliveira, C., Gravato, C., Almeida, J.R., 2013. Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo(a)pyrene in the common prawn *Palaemon serratus*. *Mar. Environ. Res.* 90, 39–46.
- Simpson, S., Angel, B., Hamilton, I., Spadaro, D., Binet, M., 2008. Appendix 7, Water and Sediment Characterisation and Toxicity Assessment for the Solwara 1 Project Environmental Impact Statement in Coffey Natural Systems. Solwara 1 Project Environmental Impact Statement [<http://www.nautilusminerals.com/irm/content/environment-reports2.aspx?RID=413>].
- Van Dover, C.L., 2014. Impacts of anthropogenic disturbances at deep-sea hydrothermal vent ecosystems: a review. *Mar. Environ. Res.* 102, 59–72.
- Van Dover, C.L., Fry, B., Grassle, J.F., Humphris, S., Rona, P.A., 1988. Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar. Biol.* 98, 209–216.
- Vereshchaka, A., 1997. Comparative morphological studies on four populations of the shrimp *Rimicaris exoculata* from the Mid-Atlantic Ridge. *Deep Sea Res. I* 44, 1905–1921.
- Viarengo, A., Nott, J., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 104C, 355–372.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, R1612–R1619.
- Vinagre, C., Madeira, D., Mendonça, V., Dias, M., Roma, J., Diniz, M.S., 2014. Effect of temperature in multiple biomarkers of oxidative stress in coastal shrimp. *J. Therm. Biol.* 41, 38–42.
- White, S., Rainbow, P., 1982. Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8, 101.
- White, S., Rainbow, P., 1985. On the metabolic requirements for copper and zinc in molluscs and crustaceans. *Mar. Environ. Res.* 16, 215–229.
- Zbinden, M., Cambon-Bonavita, M.-A., 2003. Occurrence of deferribacterales and entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 23–30.
- Zbinden, M., Le Bris, N., Gaill, F., Compère, P., 2004. Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284, 237–251.
- Zbinden, M., Shillito, B., Le Bris, N., de Villardi de Montlaur, C., Roussel, E., Guyot, F., Gaill, F., Cambon-Bonavita, M.-A., 2008. New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 359, 131–140.

4. Principaux résultats de l'étude

Cette étude donne une première évaluation des quantités de métaux, MTs, enzymes anti-oxydantes dans les différents tissus de la crevette *Rimicaris exoculata* sur le site hydrothermal TAG. Une réponse "tissus spécifique" a été observée pour les enzymes anti-oxydantes. Les crevettes semblent développer une protection contre l'exposition au Cu, par l'augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes (CAT, catalase et GST, glutathione-s-transferase) et l'induction de la MT lors de l'exposition à la plus forte concentration en Cu (4 μ M). Les données montrent une plus forte concentration de Cu dans l'hépatopancréas et une légère augmentation dans les branchies après incubations (pour les deux groupes exposés). Une induction significative de MTs a été observée dans les branchies des crevettes exposées à 4 μ M de Cu par rapport au groupe témoin. En outre, les activités des enzymes ont été détectées pour le groupe *in situ* (non soumis au Cu) montrant une protection basale contre la toxicité des métaux. L'omniprésence de la crevette *R. exoculata* le long de la dorsale médio-Atlantique et les réponses similaires à cette étude, observées sur d'autres sites (par exemple Rainbow) (Geret et al. 2002; Gonzalez-Rey et al. 2007, 2008), en font un bon modèle pour le suivi possible des effets de l'exploitation minière sur la faune hydrothermale océanique profonde. Enfin, les résultats suggèrent que la méthode proposée, comprenant une étape physiologique critique de pressurisation et dépressurisation de l'aquarium pour permettre le changement d'eau de mer au cours de l'exposition aux contaminants, ne porte pas atteinte aux crevettes en termes de réponses des biomarqueurs à l'exposition aux métaux. Cette méthode semble donc prometteuse pour évaluer la toxicité des contaminants des espèces hydrothermales océaniques profondes.

Des futures travaux sur le méta-transcriptome des épibiontes de *Rimicaris exoculata* permettrait d'identifier les facteurs de régulation sur ou sous exprimés à la suite d'une incubation en présence de cuivre à diverse concentrations (0,4 μ M et 4 μ M). En outre ceci permettrait de voir d'une part la réponse des communautés symbiotiques à un stress au cuivre et d'autre part, d'observer une éventuelle interruption ou un dysfonctionnement de la symbiose (communication, rôle trophique).

Annexe 2

Etude en cours :

Etude de la diversité symbiotique chez la crevette
mâle hydrothermale *Rimicaris exoculata*



1. Introduction de l'étude

Les études précédentes ont montré que la crevette *Rimicaris exoculata* vit en agrégats denses et mobiles le long de la paroi des cheminées actives (Williams et Rona., 1986). Les lignées symbiotiques présentes dans son céphalothorax (Zbinden et al., 2004, 2008 ; Petersen et al., 2010 ; Hügler et al., 2011 ; Guri et al., 2012 ; Jan et al., 2014) et son tube digestif (Durand et al., 2010, 2015) sont spécifiques et la mise en place de cette symbiose est contrôlée et stable probablement grâce à la mise en place de systèmes de communication durant la colonisation symbiotique (cf chapitre 3. I) et le système immunitaire de l'hôte (cf chapitre 3. II). Lors de la campagne océanographique BICOSE en 2014, un recensement des populations de *Rimicaris exoculata* a été effectué au niveau du site hydrothermal TAG. Celui-ci a montré que les agrégats de crevettes étaient constitués en très grande majorité de femelles et que de nombreux spécimens de *Rimicaris exoculata* mâles étaient situés à la périphérie du site actif (Hernandez et al., en cours). Ces spécimens étant éloignés des sites actifs, est-il possible pour la communauté symbiotique retrouvée chez les crevettes femelles (agrégats) de s'établir chez les individus mâles ? Afin de déterminer si les mâles possèdent une telle symbiose et si oui, quelles sont les lignées présentes, une étude de la diversité a été entreprise à l'aide des techniques de biologie moléculaire et de microscopie FISH.

D'autre part, les études présentées dans les chapitres 3 et 4 (gènes du Quorum Sensing et caractérisation d'un peptide antimicrobien) ont également été menées chez les individus *R. exoculata* mâles afin de déterminer si les mécanismes permettant la régulation et l'établissement de la communauté symbiotique étaient également présents.

2. Méthode expérimentale

Les ADN totaux ont été extraits à partir des branchiostégites, scaphognathites, tubes digestifs et estomacs de *R. exoculata* mâles en début et fin de cycle de mue. Le gène codant l'ARNr 16S a été amplifié par PCR afin d'étudier la diversité phylogénétique. Les produits PCR ont été clonés et séquencés par GATC Biotech (Allemagne). Les séquences obtenues sont comparées aux séquences disponibles en banques grâce au service en ligne BLAST (Basic Local Alignment Tool) (Altschul et al., 1997) afin de déterminer leurs affiliations génétiques. L'alignement des séquences est réalisé avec Maft (Kato et al., 2002) à l'aide du logiciel Geneious © version 6.1.5 logiciel (Biomatters, disponible à partir de (<http://www.geneious.com/>) et alignées.

3. Etude en cours : étude de la diversité symbiotique chez la crevette hydrothermale mâle *Rimicaris exoculata*

Six banques de clones ont été réalisées (Tableau 10), représentant au total 725 séquences de clones pour les crevettes mâles des agrégats (403) et les crevettes mâles situés en périphérie. L'analyse des banques de clones est partiellement quantitative car la méthode d'échantillonnage et les techniques moléculaires utilisées introduisent des biais (Bent et Forney, 2008 ; Quince et al., 2008). La diversité phylogénétique entre les mâles situés en périphérie et les mâles proches de la cheminée active est comparée, mais des précautions sont à prendre.

Tableau 10 : Distribution des banques de clones du gène ARNr 16S chez les crevettes mâles *R. exoculata* situés à proximité (agrégats) ou en périphérie (nasse) des cheminées hydrothermales actives du site TAG.

Groupes Phylogénétiques	Nombres de clones					
	Céphalothorax		Estomac		Tube digestif	
	Agrégats	Nasse	Agrégats	Nasse	Agrégats	Nasse
<i>Epsilonproteobacteria</i>	35	87	24	67	19	4
<i>Gammaproteobacteria</i>	16	15	19	14	6	82
<i>Alphaproteobacteria</i>	13	0	1	5	0	0
<i>Deltaproteobacteria</i>	2	0	0	1	0	0
Mollicutes	1	0	87	4	2	0
Bacteroidetes	11	4	0	1	0	0
<i>Deferribacteres</i>	0	0	0	0	36	19
Firmicutes	0	0	0	0	28	19
BD1-5	6	0	0	0	0	0
Candidates division	0	0	5	0	0	0
Total	83	106	136	92	91	124

Tout en tenant compte que notre approche n'est pas quantitative, les données brutes des banques de clones nous indiquent qu'en moyenne pour le céphalothorax des mâles des agrégats, les banques de clones sont majoritairement dominées par 4 phyla affiliés aux *Epsilonproteobacteria* (43%), aux *Gammaproteobacteria* (19%), aux *Alphaproteobacteria* (15%), et aux Bactéroïdètes (13%). Bien que des séquences affiliées aux *Deltaproteobacteria*, aux Mollicutes et aux BD1-5 aient été détectées, elles ne

représentent qu'une faible fraction des clones (10%) (Figures 55). Les banques de clones des mâles en périphéries, contrairement aux agrégats, sont très largement dominées par des séquences affiliées aux *Epsilonproteobacteria* (82%) et aux *Gammaproteobacteria* (14%).

En ce qui concerne l'estomac et le tube digestif, on observe des variations dans les groupes de séquences dominants, entre les mâles des agrégats et ceux éloignés de la cheminée active (Figure 55). En effet, pour l'estomac des mâles de l'agrégat, les banques de clones sont majoritairement composées de 4 phyla affiliés aux Mollicutes (64%), aux *Epsilonproteobacteria* (18%), aux *Gammaproteobacteria* (14%) et les candidates division OD1 (4%). A l'inverse, pour l'estomac des mâles en périphérie, les séquences de clones sont majoritairement affiliées aux *Epsilonproteobacteria* (73%), puis aux *Gammaproteobacteria* (15%) et aux Mollicutes (4%).

Enfin la diversité des séquences des banques de clones du tube digestifs varient selon que les mâles soient situés dans les agrégats ou en périphérie de ces derniers (Figure 55). Les séquences des clones sont majoritairement affiliées aux *Deferribacteres* (39%), aux Firmicutes (30%) et aux *Epsilonproteobacteria* (21%), alors que les séquences des mâles des nasses sont en très grande majorité affiliées aux *Gammaproteobacteria* (66%), ainsi qu'aux *Deferribacteres* (15%) et Firmicutes (15%). Ce shift des populations symbiotiques du tube digestif fait penser au shift des populations observé lors des expériences de jeûne (Durand et al., 2010). Ceci pourrait être expliqué par les changements des conditions physiologiques du tube digestif provoqué par le jeûne. L'élimination du bol alimentaire conduit à une diminution des minéraux et un apport en oxygène. Ceci serait favorable aux *Proteobacteria* mais délétère pour les *Deferribacteres*, qui sont anaérobies strictes (Janssen et al., 2002 ; Narasingarao et Häggblom, 2007).

Les premiers résultats de phylogénie semblent donc indiquer que la diversité symbiotique retrouvée chez le mâle des agrégats semble similaire à celle retrouvée chez la femelle (Durand et al., 2010 ; Guri et al., 2012).

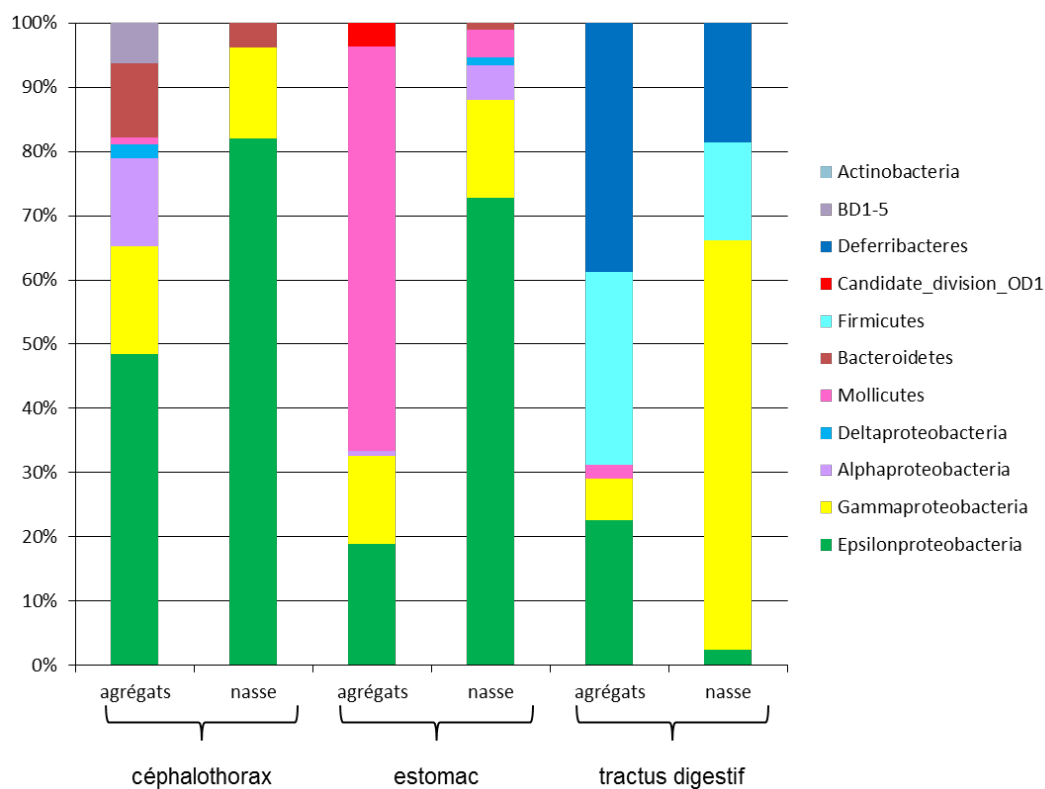


Figure 57 : Histogramme représentant la diversité symbiotique chez le mâle *Rimicaris exoculata* (résultats préliminaires). Agrégats= individus mâles prélevés au niveau des essais autour de la paroi de la cheminée active ; Nasse= individus mâles prélevés en périphérie.

Ces résultats sont préliminaires, les résultats de clonages n'étant pas quantitatifs. Cependant, ils montrent que la diversité symbiotique est plus importante pour les mâles situés dans les agrégats par rapport à ceux situés en périphérie, largement représentée par les *Gammaproteobacteria*. Les conditions physico chimiques autour des cheminées actives sont plus fluctuantes, et les eaux des habitats des agrégats de crevettes sont plus chargées en divers composés (métaux, composés réduits, matière organique...) pouvant être utilisés par un grand nombre de microorganismes, dont les symbiontes chimiosynthétiques. A l'inverse ces composés sont plus dilués avec l'éloignement au site actif, favorisant la prédominance de certains phyla (type *Alteromonas* très ubiquistes des eaux froides), et sans doute expliquant l'impossibilité pour d'autres phyla de se développer de façon optimale (tels les chemoautotrophes). Afin de confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire de séquencer un plus grand nombre de clones et surtout d'étudier la diversité symbiotique sur un plus grand nombre d'individus. D'autre part, des variations dans les proportions de clones affiliés à différents phyla sont observées lorsque l'on s'éloigne de la cheminée active. En effet les Mollicutes majoritairement présents dans l'estomac des individus proches de la cheminée laissent place aux *Epsilonproteobacteria* pour les mâles situés en périphérie. De même les communautés

des *Deferribacteres* et *Deltaproteobacteria* majoritaires dans le tractus digestif des mâles des agrégats diminuent au profit de celle des *Gammaproteobacteria* en périphérie. Ces résultats rappellent ceux obtenus par Durand et al en 2010 suite à des jeûnes longs de 72h. Ainsi, en dehors des zones actives principales, les mâles pourraient être en phase de jeûne imposé.

La prédominance des *Gammaproteobacteria* dans la communauté symbiotique du céphalothorax a été confirmée par des expériences de FISH (Figure 56). Les résultats de microscopie FISH ont par ailleurs mis en évidence un très grand nombre de *Gammaproteobacteria* de type méthanotrophe, qui jusqu'ici n'ont été observées qu'en faible proportion (Guri et al., 2012). Des mesures de chimie au niveau des sites de prélèvements de ces individus mâles a montré une concentration plus importante en méthane par rapport aux autres éléments (données BICOSE2014, C. Cathalot unpublished data). Ceci pourrait donc expliquer la présence d'un nombre important de *Gammaproteobacteria* de type méthanotrophe mais qui reste à confirmer par de nouvelles observations et par approche moléculaire. Une étude précédente réalisée sur deux types de moules (*Bathymodiolus azoricus* et *B. heckerae*) utilise le rapport $\text{CH}_4/\text{H}_2\text{S}$ afin de déterminer la relative abondance des symbiotes de types chemoautotrophes et méthanotrophes au sein d'une même communauté (Salerno et al., 2005). Si le rapport $\text{CH}_4/\text{H}_2\text{S}$ est inférieur à un alors les chemoautotrophes sont dominantes, mais si ce rapport est supérieur à deux, alors les symbiotes méthanotrophes dominant. L'étude du rapport $\text{CH}_4/\text{H}_2\text{S}$ pourrait donc être faite chez les individus mâles des agrégats et situés en périphérie de la cheminée afin de confirmer cette proportion plus importante de *Gammaproteobacteria* méthanotrophes observées chez les mâles éloignés de la zone active de la cheminée.

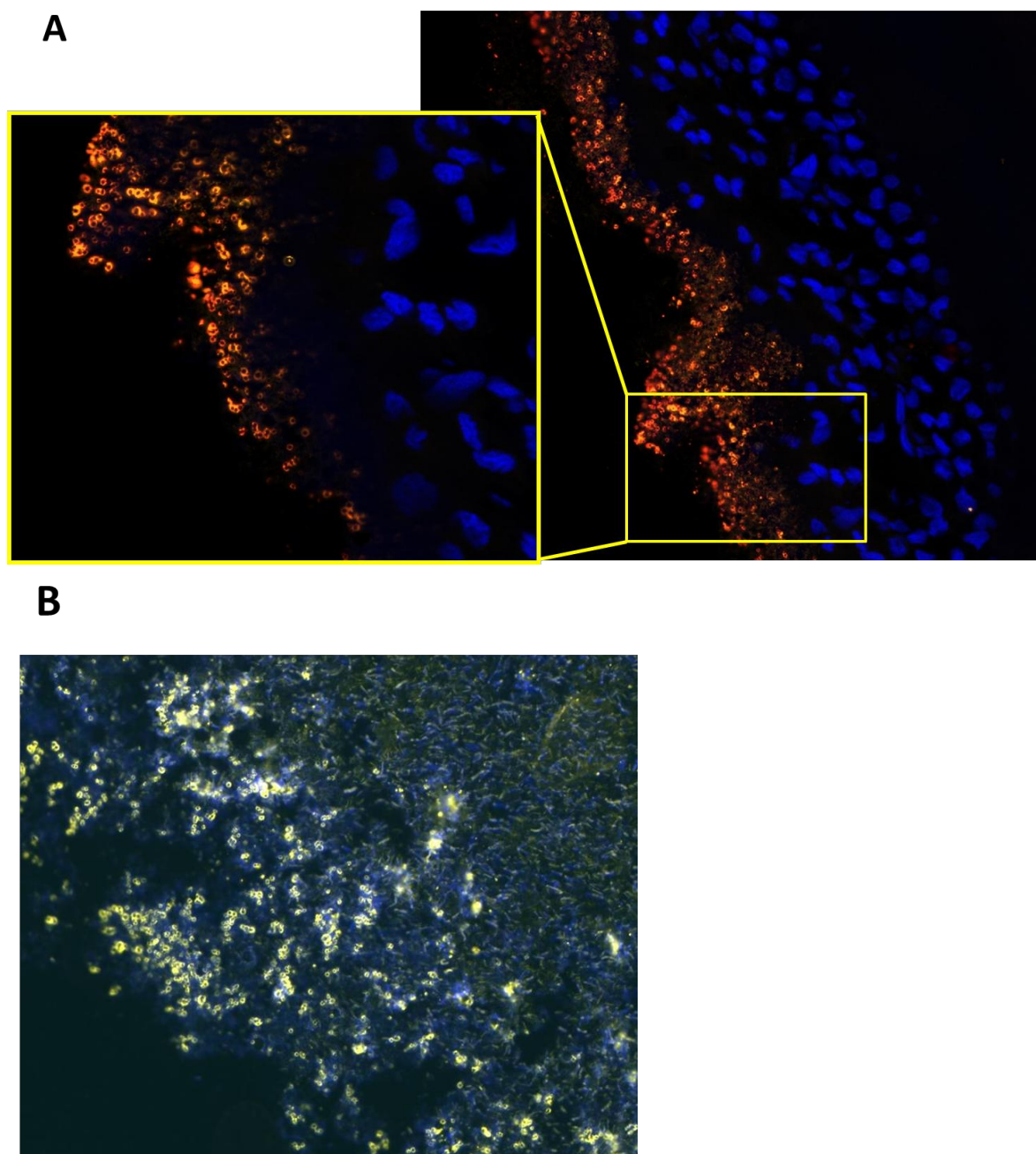


Figure 58 : Observation en microscopie FISH d'ectosymbiontes situés sur la lame branchiostège du céphalothorax de la crevette *Rimicaris exoculata* mâle de la nasse. Hybridation des bactéries avec les sondes Eub338 marquées en Cy3 (A), les méthanotrophes sont marquées avec la sonde LBI32/130 (B), l'ADN eucaryote est marqué en bleu (DAPI) (A et B). (A) Epibiontes bactériens (en rouge) situés à la face interne de la lame branchiostège (en bleu). (B) *Gammaproteobactéria* méthanotrophes (en jaune) présentant la forme caractéristique dit en "doonuts".

Valorisations scientifiques au cours de ce doctorat

Articles:

Le Bloa S, Durand L, Cueff- Gauchard C, Le Bars J, Taupin L, Marteau C, Bazire A, Cambon-Bonavita MA (2016) Highlighting of Quorum Sensing *lux* genes and their expression in the ectosymbiotic community of the shrimp *Rimicaris exoculata*. Possible used as for biogeography. (en révision).

Le Bloa S, Boidin-Wichlaz C, Cueff- Gauchard C, Cambon-Bonavita MA, Tasiemski A. (2016) Identification of *Re*-crustin, an antimicrobial peptide implicated in the vital ectosymbiosis of the extremophile vent shrimp *Rimicaris exoculata*. (en préparation).

Auguste M, Mestre NC, Rocha TL, Cardoso C, Cueff-Gauchard V, **Le Bloa S**, Cambon-Bonavita MA, Shillito B, Zbinden M, Ravaux J, Bebianno MJ (2016). Development of an ecotoxicological protocol for the deep-sea fauna using the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Aquat Toxicol.* **175**:277-85.

Congrès nationaux et internationaux:

Le Bloa S, Durand L, Cueff- Gauchard C, Taupin L, Bazire A, Cambon-Bonavita MA Toward a better understanding of the symbiotic relationships in *Rimicaris exoculata* model (September 2014) 4th International Workshop on deep-sea Microbiology, Brest (France) (présentation orale).

Le Bloa S, Durand L, Cueff- Gauchard C, Le Bars J, Taupin L, Marteau C, Bazire A, Cambon-Bonavita MA. Mode de reconnaissance hôte-symbionte en milieu extrême : cas de *Rimicaris exoculata* (May 2015). (présentation orale). Colloque Connect1, Le Mans (France).

Le Bloa S, Durand L, Cueff- Gauchard C, Le Bars J, Taupin L, Marteau C, Bazire A, Cambon-Bonavita MA Toward a better understanding of the symbiotic relationships in *Rimicaris exoculata* model (July 2015). (poster, Annexe). 8th International Symbiosis Society Congress (ISS), Lisbon (Portugal).

Le Bloa S, Durand L, Cueff- Gauchard C, Le Bars J, Taupin L, Marteau C, Bazire A, Cambon-Bonavita (October 2015).“ Toward a better understanding of the symbiotic relationships in *Rimicaris exoculata* model”. (présentation orale, *Invited speaker*) General meeting of the LabexMer Axis 3 Geobiological interactions in extreme environments, Brest, (France).

Le Bloa S, Durand L, Cueff- Gauchard C, Le Bars J, Taupin L, Marteau C, Bazire A, Cambon-Bonavita MA Toward a better understanding of the symbiotic relationships in *Rimicaris exoculata* model: looking for a new antimicrobial peptide (December 2015). (poster, Annexe) Colloque Immunité des Invertébrés, Lille (France).

Le Bloa S, Boidin-Wichlaz C, Cueff- Gauchard C, Cambon-Bonavita MA, Tasiemski A. (May 2016) First antimicrobial peptide description from the vent shrimp *Rimicaris exoculata*: new insights in symbiotic relationships. (présentation orale). Colloque Connect2, Brest (France)

Le Bloa S, Durand L, Cueff- Gauchard C, Le Bars J, Taupin L, Marteau C, Bazire A, Cambon-Bonavita MA (August 2016) Highlighting of Quorum Sensing *lux* genes and their expression in the ectosymbiotic community of the shrimp *Rimicaris exoculata*. Possible used for biogeography. (poster, cf Annexe), 16th International Society for Microbiology Ecology (ISME), Montreal (Canada).

Campagne océanographique:

Participation à la campagne océanographique BICOSE 2014 (Biodiversité, Interaction, Connectivité et Symbiose en milieux Extrêmes) ayant lieu sur les sites hydrothermaux TAG et Snake Pit en janvier et février 2014). Réalisation d'expérimentations in vivo, dissections de spécimens, préparation d'échantillons, fixations et réalisation de quart de suivi du ROV pour l'échantillonnage et les mesures *in situ*.

Collaborations :

Une partie de ces travaux a été réalisée de manière ponctuelle au LBCM à Lorient d'Avril à Juillet 2014, et au GEPU à Lille du 1^{er} février au 31 mars 2016 et du 5 au 16 septembre 2016.

Autres:

- Membre du comité scientifique et organisateur du colloque Connect2 ayant lieu du 9 au 11 mai 2016. (<https://connect2.sciencesconf.org/resource/page/id/6>)
- Membre organisateur de la soirée grand public "Autour d'une bière avec des chercheurs" dans le cadre du colloque Connect2 sur la thématique "Les symbioses sous pression".
- Participation à la finale Bretagne du concours "Ma thèse en 180 secondes"
- Organisateur du stand du LM2E pour la Nuit de la Recherche Européenne à Brest en septembre 2016.
- Représentant des doctorants au Conseil de Laboratoire du LM2E en 2015 et 2016.
- Membre fondateur de la Newsletter du LM2E et rédacteur en chef de Janvier 2015 à Juin 2016. (<https://wwz.ifremer.fr/umr6197/Newsletters>).

Annexe 3



Toward a better understanding of the symbiotic relationships in *Rimicaris exoculata* model

Simon Le Bloa^{1,2}, Lucile Durand², Laure Taupin³, Charlotte Marteau³, Alexis Bazire³, Marie-Anne Cambon-Bonavita¹

¹ Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes LM2E-UMR 6197, Ifremer Centre Bretagne, CS 10070, 29280 Plouzané; ² Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbiennes LUBEM, EA 3882, 2 rue de l'Université, IUT, bâtiment B, 29000 Quimper Cedex; ³ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines LBCM - EA 3884, Université de Bretagne-Sud, BP 92116, 56321 Lorient Cedex.



Background

The caridean shrimp *Rimicaris exoculata* dominates the megafauna of some Mid Atlantic ridge vent sites. It has two distinct microbial communities whose roles remain partly understood. One of these ectosymbiotic bacterial communities is associated with mineral oxide deposits and colonizes its enlarged gill chamber (Corbati *et al.*, 2008, Guri *et al.*, 2012, Ponsard *et al.*, 2012). Its structure and establishment process reminds of biofilm ones which use a communication pathway dependent on the bacterial density called Quorum Sensing (Monroe 2007).

→ Until now, their acquisition is not fully understood.

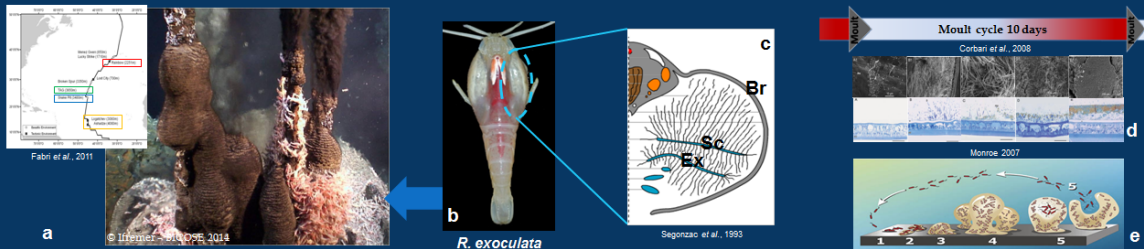


Figure 1: Localizations and physiology. a. of *R. exoculata* on hydrothermal vent and studied areas; b. *R. exoculata* (adult); c. Transversal view of shrimp gill chamber (Br: Branchiostegite; Sc: Scaphognathite; Ex: Exopodite with setae); d. Epibiotic colonisation along the moult cycle; e. Biofilm formation

Question

Quorum sensing genes have been found in the ectosymbionts metagenome (Jan *et al.*, 2014).

→ Could Quorum sensing play a key role in the community establishment process?

R. exoculata were collected at different molt stages from Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev vent sites. The presence and expression of the *lux* genes were studied by PCR, RT-PCR and Q-PCR. Characterization and quantification of communication molecules have been done by LC-MS-MS.

Results

Molecular approach

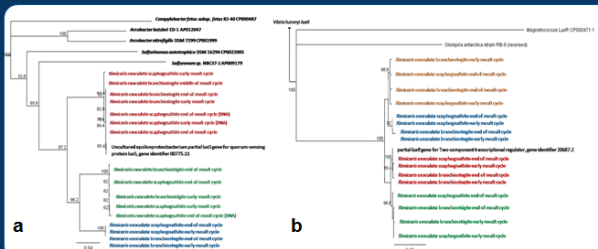


Figure 2: *lux* genes phylogeny (calculated on 550 bp and 560 bp) of symbionts associated with the gill chamber of *R. exoculata*. The robustness was tested using 500 bootstraps resampling the tree using the Neighbor-Joining algorithm with Kimura two parameters corrections matrix. a. *luxS* gene affiliated to *Epsilonproteobacteria*; b. *luxR* gene affiliated to *Gammaproteobacteria*; red: Rainbow; green: TAG; blue: Snake Pit; orange: Logatchev

• 3 haplotypes for *luxS* genes (*Epsilonproteobacteria*) and 4 haplotypes *luxR* (*Gammaproteobacteria*) distributed according to the Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev vent sites. → Potential biogeographical genetic markers of *Rimicaris* epibionts

• RT-PCR experiments have shown that the *lux* genes are active at the end of the moult cycle

Biochemical approach

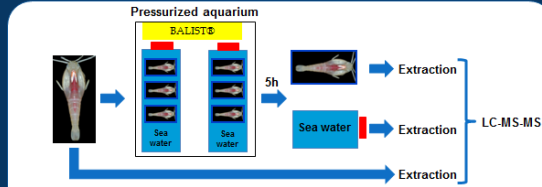


Figure 3: Extraction and detection of acylhomoserine lactones

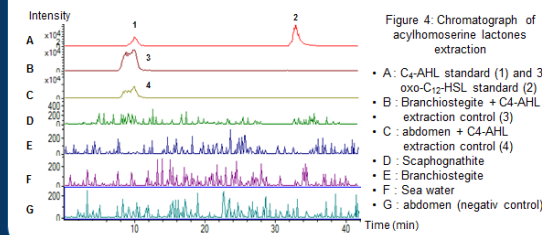


Figure 4: Chromatograph of acylhomoserine lactones extraction

• A: C₁₂-AHL standard (1) and 3-oxo-C₁₂-HSL standard (2)
• B: Branchiostegite + C4-AHL extraction control (3)
• C: abdomen + C4-AHL extraction control (4)
• D: Scaphognathite
• E: Branchiostegite
• F: Sea water
• G: abdomen (negativ control)

→ No detection of acylhomoserine lactones (AHL)

Conclusion

→ First study of quorum sensing at hydrothermal ecosystems

Molecular approach:

- *luxS* affiliated to *Epsilonproteobacteria*
- *luxS* activity at the end of molting cycle on Rainbow and TAG vent sites
- *luxR* affiliated to *Gammaproteobacteria*

Biochemical approach:

- No acylhomoserine lactones highlighted

→ Future search:

Quantification of quorum sensing activity along the molt cycle (Q-RT-PCR) AI-2 detection assays using reporter strain

References:
Corbati L., Zindler M., Cambon-Bonavita M.A., Guri C., Compère P. (2008). Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquat. Biol.* 1:225-238.
Guri M., Durand L., Cuffé-Gauchard V., Zindler M., Compère P., Shilko B., Cambon-Bonavita M.A. (2012). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME J.* 6:557-568.
Jan C., Petersen J., Werner J., Tseing H., Huang S., Glickler F.O., Golyshina O., Dubler N., Joblov M., Cambon-Bonavita M.A. (2014). The gill chamber epibiosis of deep-sea *Rimicaris exoculata*: an in-depth metagenomic investigation and discovery of *Zetaproteobacteria*. *Environmental Microbiol.* 15(9): 2723-2738.
Monroe D. (2007). Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* 5:2458-2461.
Ponsard J., Cambon-Bonavita M.A., Zindler M., Legendre O., Jossan A., Corbati L., Shilko B., Durand L., Cuffé-Gauchard V., Compère P. (2012). Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J.* 12:1751-1762.
Segonzac M., Desautels M., Casanova B. (1993). Ecology of the trophic adaptation of the shrimp *Alvinocarididae* in hydrothermal areas along the Mid-Atlantic Ridge. *Can. J. Biol.* 34(4):555-571.

9th International Symbiosis Society Congress, Lisbon, Portugal, July 12-18, 2015

Annexe 4



Toward a better understanding of the symbiotic relationships in *Rimicaris exoculata* model: looking for a new antimicrobial peptide

Simon Le Bloa^{1,2}, Lucile Durand², Laure Taupin³, Charlotte Marteau³, Alexis Bazire³, Marie-Anne Cambon-Bonavita¹

¹ Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes LM2E-UMR 6197, Ifremer Centre Bretagne, CS 10070, 29200 Plouzané; ² Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbiennes LUBEM EA 3882, 2 rue de l'Université, IUT, bâtiment B, 29000 Quimper Cedex; ³ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines LBCM- EA 3884, Université de Bretagne-Sud, BP 92116, 56321 Lorient Cedex.



Colloque Immunité des Invertébrés 2015, Lille, France, December 9-11, 2015

Background

The caridean shrimp *Rimicaris exoculata* dominates the megafauna of some Mid Atlantic ridge vent sites. It has two distinct microbial communities whose roles remain partly understood. One of these ectosymbiotic bacterial communities is associated with mineral oxide deposits and colonizes its enlarged gill chamber (Corbani *et al.*, 2008, Guri *et al.*, 2012, Ponsard *et al.*, 2012). Its structure and establishment process reminds of biofilm ones which use a communication pathway dependent on the bacterial density called Quorum Sensing (Monroe 2007).

→ Until now, their acquisition is not fully understood.

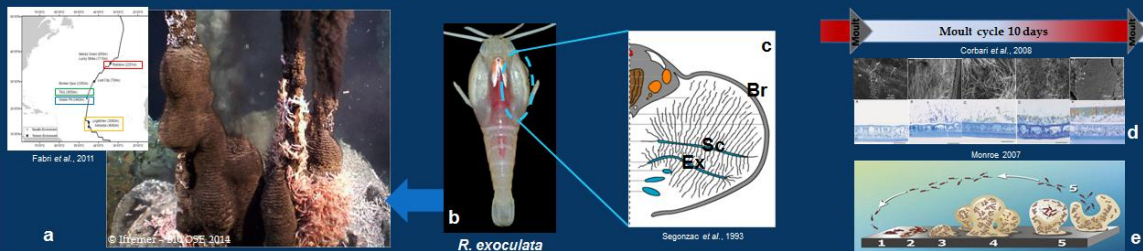


Figure 1: Localizations and physiology. a. of *R. exoculata* on hydrothermal vent and studied areas; b. *R. exoculata* (adult); c. Transversal view of shrimp gill chamber (Br: Branchiostegite; Sc: Scaphognathite; Ex: Exopodite with setae); d. Epibiotic colonisation along the moult cycle; e. Biofilm formation

Question

Quorum sensing genes have been found in the ectosymbionts metagenome (Jan *et al.*, 2014).

→ Could Quorum sensing play a key role in the community establishment process?

R. exoculata were collected at different molt stages from Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev vent sites. The presence and expression of the *lux* genes were studied by PCR, RT-PCR and Q-PCR. Characterization and quantification of communication molecules have been done by LC-MS-MS.

Results

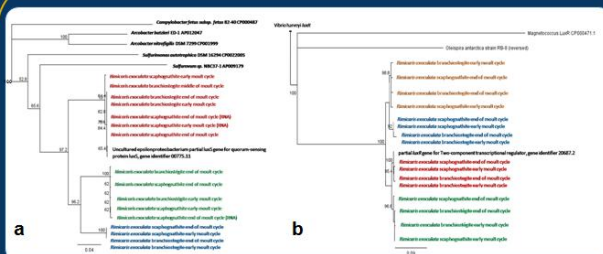


Figure 2: *lux* genes phylogeny (calculated on 550 bp and 560 bp) of symbionts associated with the gill chamber of *R. exoculata*. The robustness was tested using 500 bootstraps resampling the tree using the Neighbor-Joining algorithm with Kimura two parameters corrections matrix. a. *luxS* gene affiliated to *Epsilonproteobacteria*; b. *luxR* gene affiliated to *Gammaproteobacteria*; red: Rainbow; green: TAG; blue: Snake Pit; orange: Logatchev

- 3 haplotypes for *luxS* genes (*Epsilonproteobacteria*) and 4 haplotypes *luxR* (*Gammaproteobacteria*) distributed according to the Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev vent sites.
- RT-PCR experiments have shown that the *lux* genes are active at the end of the moult cycle
- No detection of acylhomoserine lactones by LC-MS-MS

Conclusion

→ First study of quorum sensing at hydrothermal ecosystems

Molecular approach:

- *lux* genes = potential biogeographical genetic markers of epibionts
- *lux* activity at the end of the moult cycle

Biochemical approach:

- No acylhomoserine lactones highlighted

Future Search

Here comes the AMP



Alvinella pompejana



Rimicaris exoculata

Epibiotic bacterial community

- Dominant phylotype belonging to the *Epsilonproteobacteria*.
- Trophic and detoxify role.

Alvinellacin

First antibiotic isolated from a vent organism (Tasiemski *et al.*, 2014).

Shapes and control the worm's epibiotic microflora.

How does *Rimicaris* control the specific location of its symbionts?

- Previous genetic study highlighted a partial sequence of a crustin (Cottin *et al.*, 2010).
- infection experiments using pressurized aquarium:
 - study of genes expression
 - search of antimicrobial peptide

References: Corbani L., Zbinden M., Cambon-Bonavita M.-A., Gail F., Compère P. (2008). Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aquat. Biol.* 1:225-238. Guri M., Durand L., Cuffe-Gauchard V., Zbinden M., Crassous P., Shilto B., Cambon-Bonavita M.-A. (2012). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME J.* 6:597-609. Jan C., Petersen J., Werner J., Teeling H., Huang S., Glöckner F.O., Golyshina O., Dubilier N., Golyshin P., Jebbar M., Cambon-Bonavita M.-A. (2014). The gill chamber epibiosis of deep-sea *Rimicaris exoculata*: an in-depth metagenomic investigation and discovery of *Alvinellabacteria*. *Environmental Microbiol.* 16(9): 2723-2738. Monroe D. (2007). Looking for Chitin in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* 5:2458-2461. Ponsard J., Cambon-Bonavita M.-A., Zbinden M., Lippert G., Joassin A., Corbani L., Shilto B., Durand L., Cuffe-Gauchard V., Compère P. (2012) Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J.* 12:1751-1762. Segonzac M., Desautels M., Casanova B. (1993). Enigma of the trophic adaptation of the shrimp *Alvinellidae* in hydrothermal areas along the Mid-Atlantic Ridge. *Cah Biol Mar* 34(4):535-571. Tasiemski A., Jung S., Bodin-Wichacz C., Jollivet D., Cuvillier-Hot V., Pradillon F., Vietriani C., Hacht O., Sönichsen F.D., Gehrau C., Hung C.W., Tholey A., Legge M., Grödzinger J., Gail F. (2014). Characterization and function of the first antibiotic isolated from a vent organism: the extremophile metazoan *Alvinella pompejana*. *PLoS One* 9(4): e95717

Quorum Sensing possible involvement during the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* symbiont gill chamber colonisation

Simon Le Bloa^{1,2,3}, Lucile Durand¹, Laure Taupin⁴, Charlotte Marteau⁴, Valérie Cueff-Gauchard^{1,2,3}, Alexis Bazire⁴, Marie-Anne Cambon-Bonavita^{1,2,3}

¹ Ifremer, Centre Bretagne, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, DEEPLME, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, ZI Pointe du Diablot, CS 10070, 29230 Plouzané, France. ² Université de Brest, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, Technopôle Iroise, 4 place Nicolas Copernic 29230 Plouzané, France. ³ CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 Ifremer-CNRS-UBO, Technopôle Iroise, 4 place Nicolas Copernic 29230 Plouzané, France. ⁴ Université de Bretagne-Sud, 44384 LBCM, Rue de Saint-Maudé, 56321 Lorient, France.



15th International Society for Microbiology Ecology, Montreal, Canada, July 21-26, 2016

Background

The caridean shrimp *Rimicaris exoculata* dominates the megafauna of some Mid Atlantic ridge vent sites (eg Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev). It has two distinct microbial communities whose roles remain partly understood. One of these ectosymbiotic bacterial communities is associated with mineral oxide deposits and colonizes its enlarged gill chamber ^{1,2,3}. Its structure and establishment process reminds of biofilm ones which use a communication pathway dependent on the bacterial density called Quorum Sensing ⁴. In a symbiotic community this mechanism could help to sustain the biofilm inside the host ⁵.

→ Until now, nothing is known regarding the recognition pathways between *Rimicaris exoculata* and its symbiotic microbial communities

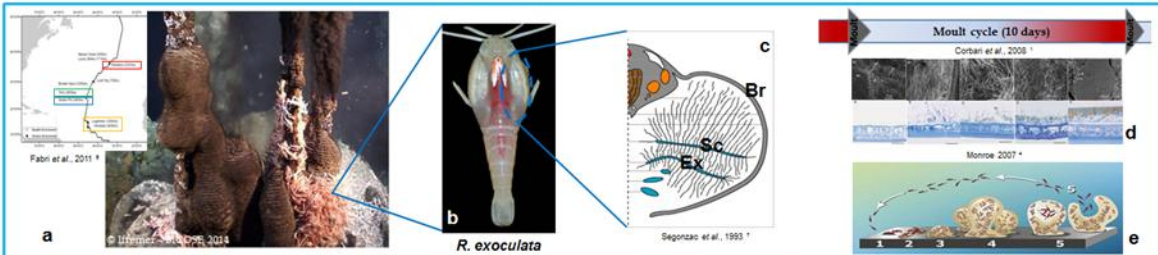


Figure 1: Localizations and physiology. a. of *R. exoculata* on hydrothermal vent and studied areas; b. *R. exoculata* (adult); c. Transversal view of shrimp gill chamber (Br: Branchiostegite; Sc: Scaphognathite; Ex: Exopodite with setae); d. Epibiotic colonisation along the moult cycle; e. Biofilm formation

Questions

Some Quorum Sensing genes (*luxS* and *luxR*) were revealed in the metagenome of the epibionts from Rainbow®

- are *lux* genes retrieved in each *Rimicaris exoculata* epibiont community from the other MAR vents sites than Rainbow ?
- could the QS could play a role in the settlement of the microbial community ?

R. exoculata were collected at different molt stages from Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev vent sites. Molecular approaches were used to explore *lux* genes specific to gill chamber epibiont communities. Characterization and quantification of communication molecules have been done by LC-MS-MS.

Results

Molecular approach

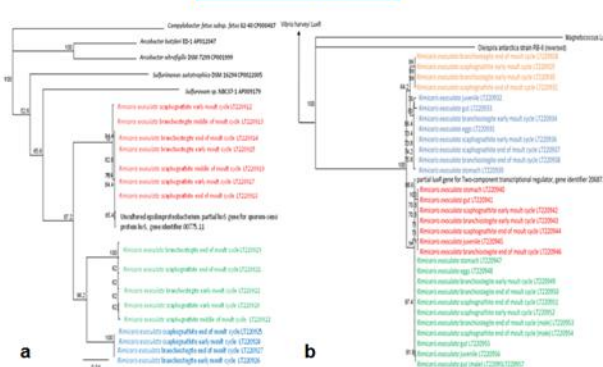


Figure 2: lux genes distribution (calculated on 550 bp and 560 bp) of symbionts associated with the gill chamber of *R. exoculata*. The robustness was tested using 500 bootstraps resampling the tree using the Neighbor-Joining algorithm with Kimura two parameters corrections matrix. a. *luxS* gene affiliated to *Epsilonproteobacteria*; b. *luxR* gene affiliated to *Gammaproteobacteria*; red: Rainbow, green: TAG, blue: Snake Pit, orange: Loatchev

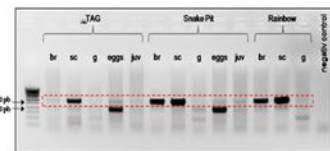


Figure 3: *lux* epibionts of the host of *R. ruber* amplifications epibiont from:

- branchiosteg
- scaphognath
- gut (g)
- eggs
- juvenile (juv)

Biochemical approach

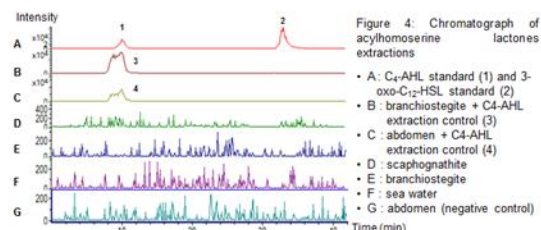


Figure 4: Chromatograph of acylhomoserine lactones extractions

→ No detection of acylhomoserine lactones (AHL)

Conclusion

- First study of quorum sensing at hydrothermal ecosystems

- Whatever the life cycle, from eggs (only *luxR*) to the adults, or the moult cycle period, *luxS* or *luxR* gene phylogenetic analyses gave a single haplotype per site of origin: 3 ribotypes for *luxS* genes (*Epsilonproteobacteria*) and 4 ribotypes *luxR* (*Gammaproteobacteria*).
- **Potential biogeographical genetic markers of *Rimicaris* epibionts**
- RT-PCR experiments have shown that the *lux* genes are active at the end of the moult cycle. → **Potential Quorum Sensing activity of *Rimicaris* epibionts during colonisation**
- **Future search:**
Quantification of Quorum Sensing activity along the moult cycle (Q-RT-PCR)
Al-2 detection assays using reporter strain

[illegible]



Bibliographie



A

Adams DG, Duggan PS (2008) Cyanobacteria–bryophyte symbioses. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1047-1058.

Adin DM, Phillips NJ, Gibson BW, Apicella MA, Ruby EG, McFall-Ngai MJ et al. (2008) Characterization of *htrB* and *msbB* Mutants of the Light Organ Symbiont *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 633-644.

Aeckersberg F, Lupp C, Feliciano B, Ruby EG (2001) *Vibrio fischeri* Outer Membrane Protein OmpU Plays a Role in Normal Symbiotic Colonization. *J Bacteriol* **183**: 6590-6597.

Ahlgren NA, Harwood CS, Schaefer AL, Giraud E, Greenberg EP (2011) Aryl-homoserine lactone Quorum Sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **108**: 7183-7188.

Aida M, Kanemori M, Kubota N, Matada M, Sasayama Y, Fukumori Y (2008) Distribution and population of free-living cells related to endosymbiont harbored in *Oligobranchia mashikoi* (a Siboglinid Polychaete) inhabiting Tsukumo Bay. *Microbes and Environ* **23**: 81-88.

Aketagawa J, Miyata T, Ohtsubo S, Nakamura T, Morita T, Hayashida H, et al. (1986) Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. *J. Biol. Chem* **261**: 7357-7365.

Akman L, Yamashita A, Watanabe H, Oshima K, Shiba T, Hattori M, Aksoy S (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat Genet* **32**(3):402-7. Epub 2002 Sep 3.

Allen CE, Copley JT, Tyler PA (2001) Lipid Partitioning in the Hydrothermal Vent Shrimp *Rimicaris exoculata*. *Mar Ecol* **22**: 241-253.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **17**: 3389-402.

Amparyup P, Donpuksa S, Tassanakajon A (2008a) Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. *Dev. Comp. Immunol* **32**: 1497-1509.

Amparyup P, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A (2008b) Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol. Immunol* **45**: 1085-1093.

Anger K (2001) The biology of decapod crustacean larvae; Koenemann S, editor: CRC Press.

Arockiaraj J, Gnanam AJ, Muthukrishnan D, Gudimella R, Milton J, Singh A, et al. (2013) Crustin, a WAP domain containing antimicrobial peptide from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: immune characterization. *Fish Shellfish Immunol* **34**: 109-118.

B

Bachère E, Destoumieux D, Bulet P (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* **191**: 71-88.

Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev* **198**: 149-168.

Bailly X., Jollivet D, Vanin S, Deutsch J, Zal F, Lallier F, et al. (2002) Evolution of the Sulfide-Binding Function Within the Globin Multigenic Family of the Deep-Sea Hydrothermal Vent Tubeworm *Riftia pachyptila*. *Molecular Biology and Evolution* **19**(9): 1421-1433.

Bartsev AV, Deakin WJ, Boukli NM, McAlvin CB, Stacey G, Malnoë P *et al* (2004) NopL, an Effector Protein of *Rhizobium* sp. NGR234, Thwarts Activation of Plant Defense Reactions. *Plant Physiology* **134**: 871-879.

Bassler BL, Wright M, Silverman MR (1994) Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi* sequence and function of genes encoding a 2nd sensory pathway. *Mol. Microbiol.* **13**: 273–286.

Bates JM, Mittge E, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE, Guillemin K (2006) Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology* **297**: 374-386.

Bauer R (2004) Remarkable shrimps: adaptations and natural history of Carideans: University Oklahoma Press.

Bent SJ, Forney LJ (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* **2**(7):689-95.

Biddle JF, Cardman Z, Mendlovitz H, Albert DB, Lloyd KG, Boetius A, Teske A (2012) Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *ISME J.* **6**(5):1018-31.

Blankenship-Williams LE, Levin LA (2009) Living Deep: A Synopsis of Hadal Trench Ecology. *Marine Technology Society Journal* **43**(5): 137-143.

Bosch C, Grassé PP (1984 a) Cycle partiel des bactéries chimioautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (pogonophore vestimentifère). I : Le Trophosome et les Bactériocytes. *C.R. Acad. Sei* **9**: 371-376.

Bosch C, Grassé PP (1984 b) Cycle partiel des bactéries chimioautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophore Vestimentifère). II : L'évolution des bactéries symbiotiques et des bactériocytes. *C.R. Acad. Sei* **10**: 413-419.

Brachmann AO, Brameyer S, Kresovic D, Hitkova I, Kopp Y, Manske C, et al. (2013) Pyrones as bacterial signaling molecules. *Nat.Chem.Biol* **9**: 573–578.

Brameyer S, Bode HB, Heermann R (2015) Languages and dialects: bacterial communication beyond homoserine lactones. *Trends Microbiol* **23**(9): 521-3.

Brazelton WJ, Ludwig KA, Sogin ML, Andreishcheva EN, Kelley DS, Shen C-C, et al. (2010) Archaea and bacteria with surprising microdiversity show shifts in dominance over 1,000-year time scales in hydrothermal chimneys. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(4): 1612-1617.

Bright M, Keckeis H, Fisher CR (2000). An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis. *Marine Biology* **136**: 621-632.

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

Brown KL, Hancock RE (2006) Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* **18**: 24-30.

Brugirard-Ricaud K, Duchaud E, Givaudan A, Girard PA, Kunst F, Boemare N et al. (2005). Site-specific antiphagocytic function of the *Photobacterium luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cellular Microbiology* **7**: 363-371.

Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol* **18**: 4-14.

Bu XJ, Du XJ, Zhou WJ, Zhao XF, Wang JX (2008) Molecular cloning, recombinant expression, and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Chinese J. Biotechnol* **24**: 723-732.

Bulet P, Stöcklin R (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett* **12**: 3-11.

Bulgheresi S, Schabussova I, Chen T, Mullin NP, Maizels RM, Ott JA (2006) A new C-type lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2950-2956.

Burge EJ, Madigan DJ, Burnett LE, Burnett KG (2007) Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish Shellfish Immunol* **22**: 327-339.

C

Callencic P, Flügel HJ (1995) Larval development and the formation of the gut of *Siboglinum poseidoni* Flügel and Langhof (Pogonophora, Perviate) - Evidence of protostomian affinity. *Sarsia* **80**: 73-89.

Campbell BJ, Jeannot C, Kostka JE, Luther 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 Environ Microbiol* **67**(10): 4566-4572.

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.

Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K (2006) The versatile *Epsilonproteobacteria*: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol* **4**(6): 458-468.

Campos VL, Escalante G, Yañez J, Zaror CA, Mondaca MA (2009) Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from a natural biofilm associated to volcanic rocks of Atacama Desert, Chile. *J Basic Microbiol* **49** Suppl 1: S93-7.

Cao YA, He SX, Zhou ZG, et al. (1989) Orally administered thermostable N-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. strain AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in Zebrafish. *Appl Environ Microb* **78**: 1899-908.

Cary SC, Cottrell MT, Stein, JL, Camacho F, Desbruyeres D (1997) Molecular Identification and Localization of Filamentous Symbiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **63**(3): 1124-1130.

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

Carriel-Gomes MC, Kratz JM, Barracco MA, Bachère E, Barardi CR, Simões CM (2007) *In vitro* antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**: 469-472.

Casanova B, Brunet M, Segonzac M (1993) Impact of bacterial epibiosis on functional-morphology of shrimp associated with the Mid-Atlantic hydrothermal conditions. *Cah Biol Mar* **34**: 573-588.

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**(4505): 340-342.

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

Cerenius L, Söderhäll K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* **198**: 116-126.

Chamberlain SC (2000) Vision in hydrothermal vent shrimp. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **355**(1401): 1151-1154.

Chamoy L, Nicolai M, Ravaux J, Quennedey B, Gaill F, Delachambre J (2001) A novel chitin-binding protein from the vestimentiferan *Riftia pachyptila* interacts specifically with β -chitin. *J Biol Chem* **276**: 8051-8058.

Charlou JL, Donval JP, Douville E, Knoery J, Fouquet Y, Bougault H, Jean-Baptiste P, Stievenard M, German C (1997) High methane flux between 15°N and the Azores Triple Junction, Mid-Atlantic Ridge, hydrothermal and serpentinization processes. *Eos Trans. AGU* **78**, 46, F831.

Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Jean-Baptiste P, Holm N (2002) Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14' N, MAR). *Chem Geol* **191**(4): 345-359.

Charlou JL, Donval JP, Konn C, Ondreas H, Fouquet Y (2010) High production and fluxes of H₂ and CH₄ and evidence of abiotic hydrocarbon synthesis by serpentinization in ultramafic-hosted hydrothermal systems on the Mid-Atlantic Ridge. *Geophys Monogr* **188**: 265-296.

Chiba H, Masuda H, Lee SY, Fujioka K (2001). Chemistry of hydrothermal fluids at the TAG active mound, MAR 26°N, in 1998. *Geophysical Research Letters* **28**(15): 2919-2922.

Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**: 532-537.

Cooper JE (2004) Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. In: Callow JA (ed). *Advances in Botanical Research*. Academic Press. pp 1-62.

Cooper JE (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 1355-1365.

Corbari L, Cambon-Bonavita MA, Long GJ, Grandjean F, Zbinden M, Gaill F, et al. (2008a) Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Biogeosciences* **5**(5): 1295-1310.

Corbari L, Zbinden M, Cambon-Bonavita MA, Gaill F, Compere P (2008b) Bacterial symbionts and mineral deposits in the branchial chamber of the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*: relationship to moult cycle. *Aqua Biol* **1**(3): 225-238.

Costa J-L, Paulsrud P, Rikkinen J, Lindblad P (2001) Genetic Diversity of Nostoc Symbionts Endophytically Associated with Two Bryophyte Species. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4393-4396.

Cottin D, Shillito B, Cheretemps T, Tanguy A, Léger N, Ravaux J (2010) Identification of differentially expressed genes in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* exposed to heat stress. *Mar Genomics* **3**(2): 71-8.

Crépeau V, Cambon Bonavita MA, Lesongeur F, Randrianalivelo H, Sarradin PM, Sarrazin J, Godfroy A (2011) Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiol Ecol* **76**(3): 524-40.

Cruaud P, Vigneron A, Lucchetti-Miganeh C, Ciron PE, Godfroy A, Cambon-Bonavita MA (2014) Influence of DNA extraction method, 16S rRNA targeted hypervariable regions, and sample origin on microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems. *Appl Environ Microbiol*. **80**(15): 4626-39.

Cuthbertson BJ, Shepard EF, Chapman RW, Gross PS (2002) Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics* **54**: 442-445.

Cuthbertson BJ, Büllesbach EE, Fievet J, Bachère E, Gross PS (2004) A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochem. J* **381**: 79-86.

Cuthbertson BJ, Yang Y, Bachère E, Bullesbach EE, Gross PS, Aumelas A (2005) Solution structure of synthetic penaeidin-4 with structural and functional comparisons with penaeidin-3. *J. Biol. Chem* **280**: 16009-16018.

Cuthbertson BJ, Deterding LJ, Williams JG, Tomer KB, Etienne K, Blackshear PJ, et al (2008) Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Dev. Comp. Immunol* **32**: 167-181.

D

Dale C, Plague GR, Wang B, Ochman H, Moran NA (2002) Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 12397-12402.

Davidson SK, Koropatnick TA, Kossmehl R, Sycuro L, McFall-Ngai MJ (2004) NO means 'yes' in the squid-vibrio symbiosis: nitric oxide (NO) during the initial stages of a beneficial association. *Cellular Microbiology* **6**: 1139-1151.

De Bary A (1879) Die Erscheinung der Symbiose. Naturforshung Versammlung Cassel: 121.

de Lorgeril J, Saulnier D, Janech MG, Gueguen Y, Bachère E (2005) Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. *Physiol. Genomics* **21**: 174-183.

DeKeersmaecker SC, Vanderleyden J (2003) Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology* **149**(Pt 8): 1953-6.

de la Re-Vega E, García-Galaz A, Díaz-Cinco ME, Sotelo-Mundo RR (2006) White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio cholerae*. *Fish Shellfish Immunol* **20**: 405-408.

Deming JW, Baross JA (1993) Deep-sea smokers: Windows to a subsurface biosphere? *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **57**(14): 3219-3230.

De Vries EJ, Jacobs G, Sabelis MW, Menken SBJ, Breeuwer JAJ (2004) Diet-dependent effects of gut bacteria on their insect host: the symbiosis of *Erwinia* sp and western flower thrips. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: 2171-2178.

Desbruyères D, Segonzac M, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer. (1997) Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna. Plouzané, France, IFREMER.

Desbruyères D, Chevaldonné P, Alayse AM, Jollivet D, Lallier FH, Jouin-Toulmond C, 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 Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **45**(1-3): 383-422.

Desbruyères D, Almeida A, Biscoito M, Comtet T, Khripounoff A, Le Bris N *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, Colaco A, Comtet T, Crassous P, et al. (2001) Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **48**(5): 1325-1346.

Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Van Dorsselaer A, Rodriguez J, Bachère E (1997) Penaeidins: a new family of anti-microbial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem* **272**: 28398-28406.

Destoumieux D, Bulet P, Strub JM, van Dorsselaer A, Bachère E (1999) Recombinant expression and range of activity of penaeidins, anti-microbial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem* **266**: 335-346

Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, Rodriguez J, Bulet P, Comps M, et al (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci* **113**: 461-469.

Destoumieux D, Muñoz M, Bulet P, Bachère E (2000a) Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci* **57**: 1260-1271.

Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, Rodriguez J, Bulet P, Comps M, et al. (2000b) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci.* **113** (Pt 3): 461-469.

Destoumieux-Garzon D, Saulniner D, Garnier J, Jouffrey C, Bulet P, Bachère E (2001) Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem* **276**: 47070-47077.

- DeWayne Shoemaker D, Machado CA, Molbo D, Werren JH, Windsor DM, Herre EA (2002) The distribution of *Wolbachia* in fig wasps: correlations with host phylogeny, ecology and population structure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **269**: 2257-2267.
- Dhillon A, Teske A, Dillon J, Stahl DA, Sogin ML (2003) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin Appl. *Environ Microbiol* **69**(5): 2765-72.
- Dick GJ, Anantharaman K, Baker BJ, Li M, Reed DC, Sheik CS (2013) The microbiology of deep-sea hydrothermal vent plumes: ecological and biogeographic linkages to seafloor and water column habitats. *Front Microbiol* **4**: 124.
- Distel DL, Lane DJ, Olsen GJ, Giovannoni SJ, Pace B, Pace NR et al. (1988) Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. *J Bacteriol* **170**: 2506-2510.
- Dong YH1, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH (2001) Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* **411**:813-7.
- Donpudsa S, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A, Söderhäll I, Söderhäll K (2010) Characterization of two crustin antimicrobial peptides from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Invertebr Pathol* **104**(3): 234-8.
- Donval JP, Charlou JL, Douville E, Knoery J, Fouquet Y, Poncevera E, Jean-Baptiste P, Stievenard M, German C (1997) High H₂ and CH₄ content in hydrothermal fluids from Rainbow Site newly sampled at 36°14'N on the AMAR Segment, Mid-Atlantic Ridge (Diving FLORES cruise, July 1997): Comparison with other MAR sites. *Eos Trans. AGU* **78**, 46, F832.
- Douglas A.E (2003) Nutritional physiology of aphids. *Adv. Insect Physiol* **31**: 73-140.
- Dubilier N, Bergin C, Lott C (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Rev Microbiol* **6**: 725-740.
- Duperron S, Nadalig T, Caprais JC, Sibuet M, Fiala-Medioni A, Amann R et al (2005) Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* sp mussel from a methane seep on the gabon continental margin (southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1694-1700.
- Duperron S, Bergin C, Zielinski F, Blazejak A, Pernthaler A, McKiness ZP et al. (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia : Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **8**: 1441-1447.
- Duperron S, Sibuet M, MacGregor BJ, Kuypers MMM, Fisher CR, Dubilier N (2007) Diversity, relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico. *Environ Microbiol* **9**(6): 1423-1438.
- Duperron S, Halary S, Lorion J, Sibuet M Gaill F (2008a) Unexpected co-occurrence of six bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp. (Bivalvia: Mytilidae). *Environ Microbiol* **10**(2): 433-445.
- Duperron S, Laurent MCZ, Gaill F, Gros O (2008b) Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of *Mytilidae* associated with wood falls. *FEMS Microbiol Ecol* **63**(3): 338-349.

Durand L, Zbinden M, Cuff-Gauchard V, Duperron S, Roussel EG, Shillito B et al. (2010) Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* **71**: 291-303.

Durand L, Roumagnac M, Cuff-Gauchard V, Jan C, Guri M, Tessier C, Haond M, Crassous P, Zbinden M, Arnaud-Haond S, Cambon-Bonavita MA (2015) Biogeographical distribution of *Rimicaris exoculata* resident gut epibiont communities along the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent sites. *FEMS Microbiol Ecol* **91**(10). pii: fiv101.

Dworjanyn S, de Nys R, Steinberg PD (1999) Localization of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar. Biol* **133**: 727-736.

E

Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* **64**: 2445-2448.

Eberl L, Riedel L (2011) Mining Quorum-sensing regulated proteins - Role of bacterial cell-to-cell communication in global gene regulation as assessed by proteomics. *Proteomics* **11**: 3070-3085.

Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**(9): 2444-2449.

Eberle MW, McLean DL (1982) Initiation and orientation of the symbiote migration in the human body louse *Pediculus humanus* L. *J Insect Physiol* **28**: 417-422.

Edmond JM, Von Damm KL, McDuff RE, Measures CI (1982) Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal. *Nature* **297**(5863): 187-191.

Edmond J, Parson LM, Walker CL, Dixon DR, (1995) Hydrothermal vents and processes. *Geological Society Special Publication*. **87**: 77-86.

Edmonds HN, German CR, Green DR, Huh Y, Gamo T, Edmond JM (1996) Continuation of the hydrothermal fluid chemistry time series at TAG, and the effects of ODP drilling. *Geophysical Research Letter* **23**: 3487-3489.

Elderfield H, Schultz A (1996) Mid-Ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **24**(1): 191-224.

Elsgaard L, Isaksen MF, Jørgensen BB, Alayse A-M, Jannasch HW (1994) Microbial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas Basin hydrothermal vent area: Influence of temperature and substrates. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **58**(16): 3335-3343.

Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, Davis RE, Aldrich H, Chan C, et al. (2007) A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. *Plos One* **2**(8): e667.

F

Fabri M-C, Bargain A, Briand P, Gebruk A, Fouquet Y, Morineaux M, et al. (2011) The hydrothermal vent community of a new deep-sea field, Ashadze-1, 12°58'N on the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **91**(01): 1-13.

Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* **61**:243-82.

Felbeck H (1984) Chemoautotrophic Potential of the Hydrothermal Vent Tube Worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* **213**(4505): 336-8.

Flemming HC, Neu TR, Wozniak D (2007) The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J Bacteriol* **189**(22): 7945-7.

Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**(9): 623-33.

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

Filloux A, Vallet I (2003) Biofilm: set-up and organization of bacterial community. *Med Sci.* **19**(1): 77-83.

Fisher RF, Long SR. (1992) Rhizobium-plant signal exchange. *Nature* **357**(6380): 655-660.

Fitzsimmons JN, Boyle EA, Jenkins WJ (2014) Distal transport of dissolved hydrothermal iron in the deep South Pacific Ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(47): 16654-61.

Fouquet Y, von Stackelberg U, Charlou JL, Donval JL, Erzinger J, Herzig PM, Mühe R, Wiedicke M (1993a) Metallogenesis in back arc environment: the Lau Basin example. *Economic Geology* **88**: 2154-2181.

Fouquet Y, Charlou JL, Ondreas H, Radford-Knoery J, Donval JP, Douville E, et al. (1997) Discovery and first submersible investigations on the Rainbow hydrothermal field on the MAR (36°14'N). *Cosmos Report* **78**: 832.

Fouquet Y, Cherkashov G, Charlou JL, Ondréas H, Birot D, Cannat M, et al. (2008) Serpentine cruise - ultramafic hosted hydrothermal deposits on the Mid-Atlantic Ridge: First submersible studies on Ashadze 1 and 2, Logatchev 2 and Krasnov vent fields. *InterRidge News* **17**: 16-21.

Fouquet Y, Cambon P, Etoubleau J, Charlou JL, Ondréas H, Barriga FJ, et al. (2010) Geodiversity of Hydrothermal Processes Along the Mid-Atlantic Ridge and Ultramafic-Hosted Mineralization: A New Type of Oceanic Cu-Zn-Co-Au Volcanogenic Massive Sulfide Deposit. *Geophysical Monograph Series* **188**(American Geophysical Union): 321-367.

Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone Quorum Sensing. *Annu Rev Genet* **35**: 439-68.

Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 685-95.

Fuqua C (2006) The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *J. Bacteriol* **188**: 3169-3171.

G

Gaill F, Shillito B, Lechaire JP, Chanzy H, Goffinet G (1992) The chitin secreting system from deep-sea hydrothermal vent worms. *Biol Cell* **76**: 201-204.

Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 280-300.

Gardebrecht A, Markert S, Sievert SM, Felbeck H, Thürmer A, Albrecht D, Wollherr A, Kabisch J, Le Bris N, Lehmann R, Daniel R, Liesegang H, Hecker M, Schweder T (2012) Physiological homogeneity among the endosymbionts of *Riftia pachyptila* and *Tevnia jerichonana* revealed by proteogenomics. *ISME J.* **6**(4):766-76.

Gebruk AV, Chevaldonne P, Shank T, Lutz RA, Vrijenhoek RC (2000a) Deep-sea hydrothermal vent communities of the Logatchev area (14°45 ' N, Mid-Atlantic Ridge): diverse biotopes and high biomass. *J Mar Biol Assoc UK* **80**: 383-393.

Gebruk AV, Southward EC, Kennedy H, Southward AJ (2000b) Food sources, behaviour, and distribution of hydrothermal vent shrimps at the Mid-Atlantic Ridge. *J Mar Biol Assoc UK* **80**: 485-499.

Geret F, Riso R, Sarradin PM, Caprais JC, Cosson RP (2002) Metal bioaccumulation and storage forms in the shrimp, *Rimicaris exoculata*, from the Rainbow hydrothermal field (Mid-Atlantic Ridge); preliminary approach to the fluid-organism relationship. *Cahiers de Biologie Marine* **43**: 43-52.

Ghedini E, Wang S, Spiro D, Caler E, Zhao Q, Crabtree J, Allen JE, Delcher AL, Guiliano DB, Miranda-Saavedra D et al. (2007) Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* **317**(5845): 1756-60.

Gil R, Silva FJ, Zientz E, Delmotte F, González-Candelas F, Latorre A, Rausell C, et al. (2003) The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9388-93.

Goffredi SK, Jones WJ, Erlich H, Springer A, Vrijenhoek RC (2008) Epibiotic bacteria associated with the recently discovered Yeti crab, *Kiwa hirsuta*. *Environ Microbiol* **10**: 2623-2634.

Gonzalez-Rey M, Serafim A, Company R, Bebianno MJ (2007) Adaptation to metal toxicity: a comparison of hydrothermal vent and coastal shrimps. *Marine Ecology* **28**: 100-107.

Gonzalez-Rey M, Serafim A, Company R, Gomes T, Bebianno MJ (2008) Detoxification mechanisms in shrimp: Comparative approach between hydrothermal vent fields and estuarine environments. *Marine Environmental Research* **66**: 35-37.

González JF, Venturi V (2013) A novel wide spread interkingdom signaling circuit. *Trends Plant Sci* **18**: 167-174.

Górski A, Weber-Dabrowska B (2005) The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell Mol Life Sci.* **62**(5): 511-519.

Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure DD (2015) Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* **40**(1): 86-116.

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

Gros O, Frenkiel L, Moueza M (1998) Gill filament differentiation and experimental colonization by symbiotic bacteria in aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* (Bivalvia : Lucinidae). *Invertebrate Reproduction & Development* **34**: 219-231.

Gros O, Liberge M, Heddi A, Khatchadourian C, Felbeck H (2003) Detection of the Free-Living Forms of Sulfide-Oxidizing Gill Endosymbionts in the Lucinid Habitat (*Thalassia testudinum* Environment). *Appl Environ Microbiol* **69**: 6264-6267.

Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW (2001) Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol* **25**: 565-577.

Grzymski JJ, Murray AE, Campbell BJ, Kaplarevic M, Gao GR, Lee C, et al. (2008) Metagenome analysis of an extreme microbial symbiosis reveals eurythermal adaptation and metabolic flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(45): 17516-17521.

Gueguen Y, Garnier J, Robert L, Lefranc MP, Mougenot I, de Lorgeril J, et al (2006) PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev. Comp. Immunol* **30**: 283-288.

Guirguis PR, Lee RW (2006) Thermal preference and tolerance of alvinellids. *Science* **312**: 231.

Guri M, Durand L, Cueff-Gauchard V, Zbinden M, Crassous P, Shillito B et al (2012) Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J* **6**(3): 597-609.

H

Haddad A, Camacho F, Durand P, Cary SC (1995) Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **61**(5): 1679-1687.

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

Halliwel G, Bryant MP. (1963) The Cellulolytic Activity of Pure Strains of Bacteria from the Rumen of Cattle. *Journal of General Microbiology* **32**(3): 441-448.

Hancock R, Brown L, Mookherjee N (2006) Host defence peptides from invertebrates-emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* **211**(4): 315-22.

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

Hartmann A, Schikora A (2015) Editorial: Plant responses to bacterial Quorum Sensing molecules. *Front Plant Sci* **6**:643.

Hauton C, Brockton V, Smith VJ (2006) Cloning of a crustin-like, single whey-acidicdomain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. *Mol Immunol* **43**: 1490e6.

Heddi A, Vallier A, Anselme C, Xin H, Rahbe Y, Wäckers F (2005) Molecular and cellular profiles of insect bacteriocytes: mutualism and harm at the initial evolutionary step of symbiogenesis. *Cell Microbiol* **7**(2): 293-305.

Henke J, Bassler B (2004) Bacterial social engagements. *TRENDS in Cell Biology* **4**(11): 648-656.

Herbert EE, Goodrich-Blair H (2007) Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat Rev Micro* **5**: 634-646.

Hernández-Ávila I, Cambon-Bonavita MA, Pradillon F (2015) Morphology of First Zoeal Stage of Four Genera of Alvinocaridid Shrimps from Hydrothermal Vents and Cold Seeps: Implications for Ecology, Larval Biology and Phylogeny. *PLoS One* **10**(12): e0144657.

Herring PJ, Dixon DR (1998) Extensive deep-sea dispersal of postlarval shrimp from a hydrothermal vent. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **45**(12): 2105-2118.

Hikima S, Hikima J, Rojtinakorn J, Hirono I, Aoki T (2003) Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene* **316**: 187-195.

Holm A, Vikström E (2014) Quorum Sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front Plant Sci* **5**: 309.

Hooper LV, Gordon JI (2001) Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiol* **11**: 1R-10.

Huber JA, Butterfield DA, Baross JA (2002) Temporal Changes in Archaeal Diversity and Chemistry in a Mid-Ocean Ridge Subseafloor Habitat. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(4): 1585-1594.

Huber JA, Butterfield DA, Baross JA (2003) Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *Fems Microbiology Ecology* **43**(3): 393-409.

Hügler M, Petersen JM, Dubilier N, Imhoff JF, Sievert SM (2011) Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *PLoS Biol* **6**(1): e16018.

Hughes DT, Sperandio V (2008) Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* **6**: 111-20.

Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T (2007) Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* **42**: 467-472.

Humphris SE, Zierenberg RA, Mullineaux LS, Thomson RE (1995) Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions. Washington, DC, AGU.

Hussa EA, O'Shea TM, Darnell CL, Ruby EG, Visick KL (2007) Two-Component Response Regulators of *Vibrio fischeri*: Identification, Mutagenesis, and Characterization. *J Bacteriol* **189**: 5825-5838.

I

Imjongjirak C, Amparyup P, Tassanakajon A, Sittipraneed S (2009) Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. *Mol. Biol. Rep* **36**: 841-850.

Inagaki F, Takai K, Nealson KH, Horikoshi K (2004) *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(5): 1477-1482.

Iwanaga S, Lee BL (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol* **38**: 128-150.

J

Jan C, Petersen JM, Werner J, Huang S, Teeling H, Glöckner FO, et al. (2014) The gill chamber epibiosis of deep-sea *Rimicaris exoculata* shrimp revisited by metagenomics and discovery of zetaproteobacterial epibionts. *ISME J.* **16**(9): 2723-38.

Jannasch HW, Mottl MJ (1985) Geomicrobiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Science* **229**(4715): 717-725.

Jannasch HW, Wirsen CO (1979) Chemosynthetic Primary Production at East Pacific Sea Floor Spreading Centers. *BioScience* **29**(10): 592-598.

Janssen PH, Liesack W, Schink B (2002) *Geovibrio thiophilus* sp. nov., a novel sulfur-reducing bacterium belonging to the phylum *Deferribacteres*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(Pt 4): 1341-7.

Janvier M, Frehel C, Grimont F, Gasser F (1985) *Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., Marine Methylophages. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**(2): 131-139.

Jia YP, Wang ZH, Wang Q, Zhao XF, Wang JX (2008) A single whey acidic protein domain (SWD)-containing peptide from the fleshy prawn with antimicrobial and proteinase inhibition activities. *Aquaculture*. **284**: 246-259.

Jiang HS, Jia WM, Zhao XF, Wang JX (2015) Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*. **43**: 387-395.

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* **211**: 213-236.

Joint I, Tait K, Callow ME, Callow JA, Milton D, Williams P, Cámara M (2002) Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science* **298**: 1207.

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**(4742): 1139-1141.

Jones ML (1981) *Riftia pachyptila* Jones - Observations on the vestimentiferan worm from the Galapagos Rift. *Science* **213**: 333-336.

Jørgensen BB, Isaksen MF, Jannasch HW (1992) Bacterial Sulfate Reduction Above 100°C in Deep-Sea Hydrothermal Vent Sediments. *Science* **258**(5089): 1756-1757.

K

Kang CJ, Wang JX, Zhao XF, Yang XM, Shao HL, Xiang JH (2004) Molecular cloning and expression analysis of ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus Chinensis*. *Fish Shellfish Immunol* **16**: 513-525.

Kang CJ, Xue JF, Liu N, Zhao XF, Wang JX (2007) Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Immunol* **44**: 1535-1543.

Karl DM (1995) The microbiology of deep-sea hydrothermal vents, CRC Press.

Karson J, Brown J (1988) *Marine Geophysical Research* **10**: 91.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. (describes the FFT-NS-1, FFT-NS-2 and FFT-NS-i strategies). *Nucleic Acids Res* **30**: 3059-3066.

Kelley DS, Karson JA, Blackman DK, Fruh-Green GL, Butterfield DA, Lilley MD, et al. (2001) An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30 degrees N. *Nature* **412**(6843): 145-149.

Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF (2003) Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* **425**: 78-81.

Komai T, Segonzac M (2008) Taxonomic review of the hydrothermal vent shrimp genera *Rimicaris* Williams & Rona and *Chorocaris* Martin & Hessler (Crustacea : Decapoda : Caridea : Alvinocarididae). *J Shellfish Res* **27**: 21-41.

Kuwahara H, Yoshida T, Takaki Y, Shimamura S, Nishi S, Harada M, Matsuyama K, et al. (2007) Reduced genome of the thioautotrophic intracellular symbiont in a deep-sea clam, *Calymene okutanii*. *Curr Biol* **17**(10): 881-6.

L

Lalou C, Reyss J, Brichet E, Rona PA, Thompson G (1995) Hydrothermal activity on a 105-year scale at a slow-spreading ridge, TAG hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge 26°N. *Journal of Geophysical Research* issn: 0148-0227.

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

Le Bris N, Gaill F (2007) How does the annelid *Alvinella pompejana* deal with an extreme hydrothermal environment? *Rev Environment Sci Biotechnol* **6**: 197-221.

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

Letunic L, Doerks T, Bork P (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gkr931.

Llodra ER, Tyler PA, Copley JTP (2000) Reproductive biology of three caridean shrimp, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* and *Mirocaris fortunata* (Caridea : Decapoda), from hydrothermal vents. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **80**(3): 473-484.

Le Pennec M, Hily A (1984) Anatomie, structure et ultra structure de la branchie d'un Mytilidae des sites hydrothermaux du Pacifique Oriental. *Oceanol. Acta* **7**: 517-523.

Le Pennec M, Donval A, Henry A (1990) Nutritional strategies of the hydrothermal ecosystem bivalves. *Prog. Oceanogr* **24**: 71-80.

Lipsitch M, Nowak MA, Ebert D, May RM (1995) The population-dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. *Proc R Soc Lond B* **260**: 321-327.

Liu H, Jiravanichpaisal P, Söderhäll I, Cerenius L, Söderhäll K (2006) Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Virol* **80**: 10365-10371.

Liu Y, Liu C, Li FH, Dong B, Xiang JH (2005) Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mar. Biotechnol* **7**: 600-608.

Liu H, Jiravanichpaisal P, Söderhäll I, Cerenius L, Söderhäll K (2006) Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Virol* **80**: 10365-10371.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4):402-8.

Llodra ER, Tyler PA, Copley JTP (2000) Reproductive biology of three caridean shrimp, *Rimicaris exoculata*, *Chorocaris chacei* and *Mirocaris fortunata* (Caridea : Decapoda), from hydrothermal vents. *J Mar Biol Assoc UK* **80**: 473-484.

Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monégat C, Vigneron A, Weiss-Gayet M, Rochat D, Heddi A (2011) Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science* **334**(6054): 362-5.

Login FH, Heddi A (2013) Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. *J. Insect Physiol.* **59**: 232–239.

Loongyai W, Avarre J-C, Cerutti M, Lubzens E, Chotigeat W (2007) Isolation and functional characterization of a new shrimp ovarian peritrophin with antimicrobial activity from *Fenneropenaeus merguensis*. *Mar. Biotechnol* **9**: 624-637.

Lonsdale P, (1977) Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Research* **24**(9): 857-858, IN853-IN854, 859-863.

Lu KY, Sung HJ, Liu CL, Sung HH (2009) Differentially enhanced gene expression in hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii* challenged in vivo with lipopolysaccharide. *J. Invertebr. Pathol* **100**: 9-15.

M

Madigan M, Martinko J (2007) Brock Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition Pearson Education.

Marsh AG, Mullineaux LS, Young CM, Manahan DT (2001) Larval dispersal potential of the tubeworm *Riftia pachytila* at deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **411**: 77-80.

Masson F, Zaidman-Rémy A, Heddi A (2016) Antimicrobial peptides and cell processes tracking endosymbiont dynamics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **26**: 371(1695).

McBride MJ (2001) Bacterial gliding motility: Multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual Review of Microbiology* **55**: 49-75.

McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra S, Camara M, Daykin M, et al. (1997) Quorum Sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology* **143**: 3703-3711.

Mestre NC, Calado R, Soares AMVM (2014) Exploitation of deep-sea resources: The urgent need to understand the role of high pressure in the toxicity of chemical pollutants to deep-sea organisms. *Environmental Pollution* **185**: 369-371.

Miller B, Bassler B (2001) Quorum Sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**: 165-199.

Milne-Edwards H (1840) Histoire naturelle des crustacés, comprenant l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux. Paris, France.

Montgomery K, Charlesworth JC, LeBard R, Visscher PT, Burns BP (2013) Quorum Sensing in Extreme Environments. *Life* **3**: 131-148.

Moreira CG, Sperandio V (2012) Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* pathogenesis. *Infect Immun* **80**(12): 4344-53.

Morin D, Grasland B, Vallée-Réhel K, Dufau C, Haras D (2003) On-line high-performance liquid chromatography–mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, Quorum Sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *Journal of Chromatography A* **1002**: 79–92.

Morita T, Ohtsubo S, Nakamura T, Tanaka S, Iwanaga S, Ohashi K, et al. (1985) Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). *J. Biochem* **97**: 1611-1620.

Mota LJ, Cornelis GR (2005) The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann. Med* **37**: 234-249.

Mu C, Zheng P, Zhao J, Wang L, Qiu L, Zhang H, Gai Y, Song L (2011) A novel type III crustin (CrusEs2) identified from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol* **31**(1): 142-7.

Munchhoff J, Hirose E, Maruyama T, Sunairi M, Burns BP, Neilan BA (2007) Host specificity and phylogeography of the prochlorophyte *Prochloron* sp., an obligate symbiont in didemnid ascidians. *Environmental Microbiology* **9**: 890-899.

Muñoz M, Vandenbulcke F, Garnier J, Gueguen Y, Bulet P, Saulnier D, et al. (2004) Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell Mol. Life Sci* **61**: 961-972.

Muta T, Miyata T, Tokunaga F, Nakamura T, Iwanaga S (1987) Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *J. Biochem* **101**: 1321-1330.

N

Narasimarao P, Häggblom MM (2007) Identification of anaerobic selenate-respiring bacteria from aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol* **73**(11): 3519-27.

Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol* **104**: 313–322.

Nealson KH, Hastings JW (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43**(4): 496-518.

Nelson DC (1998) Recent progress in the microbiology of deep-sea hydrothermal vents and seeps. *Cahiers De Biologie Marine* **39**(3-4): 373-378.

Nercessian, O, Reysenbach A-L, Prieur D, Jeanthon C (2003) Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). *Environmental Microbiology* **5**(6): 492-502.

Nuckley DJ, Jinks RN, Battelle BA, Herzog ED, Kass L, Renninger GH et al. (1996) Retinal Anatomy of a New Species of Bresiliid Shrimp From a Hydrothermal Vent Field on the Mid-Atlantic Ridge. *Biol Bull* **190**: 98-110.

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

Nye V, Copley J, Plouviez S (2011) A new species of *Rimicaris* (Crustacea: Decapoda: Caridea: Alvinocarididae) from hydrothermal vent fields on the Mid-Cayman Spreading Centre, Caribbean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom FirstView*: 1-16.

Nyholm SV, McFall-Ngai MJ (2004) The winnowing: Establishing the squid-*Vibrio* symbiosis. *Nat Rev Microbiol* **2**: 632-642.

O

O'Neill PJ, Jinks RN, Herzog ED, Battelle BA, Kass L, Renninger GH, et al. (1995) The morphology of the dorsal eye of the hydrothermal vent shrimp, *Rimicaris exoculata*. *Vis Neurosci* **12**(5): 861-875.

O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S (2000) *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* **2**: 1207–1214.

Ottemann KM, Lowenthal AC (2002) *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun.* **70**: 1984–1990.

P

Patat SA, Carnegie RB, Kingsbury C, Gross PS, Chapman R, Schey K L (2004) Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur. J. Biochem* **271**: 4825-4833.

Patel HK, Suárez-Moreno ZR, Degrassi G, Subramoni S, González JF, Venturi V (2013) Bacterial LuxR solos have evolved to respond to different molecules including signals from plants. *Front Plant Sci* **4**: 447.

Pelli DG, Chamberlain SC (1989) The visibility of 350°C black-body radiation by the shrimp *Rimicaris exoculata* and man. *Nature* **337**: 460-461.

Pérez PD, Weiss JT, Hagen SJ (2011) Noise and cross-talk in two quorum-sensing inputs of *Vibrio fischeri*. *BMC Systems Biol* **5**: 153.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(1): 180-201.

Petersen JM, Ramette A, Lott C, Cambon-Bonavita M-A, Zbinden M, Dubilier N (2010) Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous gamma- and epsilonproteobacteria at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environ Microbiol* **12**: 2204-2218.

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

Plummer P, Sahin O, Burrough E, Sippy R, Mou K, Rabenold J et al. (2012) Critical role of LuxS in the virulence of *Campylobacter jejuni* in a guinea pig model of abortion. *Infect Immun* **80**: 585–593.

Polz MF, Cavanaugh CM (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7232-7236.

Polz MF, Robinson JJ, Cavanaugh CM, Van Dover CL (1998) Trophic ecology of massive shrimp aggregations at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Limnol Oceanogr* **43**: 1631-1638.

Pomerol C, Renard M, Lagabrielle Y, (2005) *Éléments de géologie*, Paris : Dunod.

Pond DW, Segonzac M, Bell MV, Dixon DR, Fallick AE, Sargent JR (1997) Lipid and lipid carbon stable isotope composition of the hydrothermal vent shrimp *Mirocaris fortunata*: evidence for nutritional dependence on photosynthetically fixed carbon. *Mar Ecol Prog Ser* **157**: 221-231.

Pond DW, Sargent JR, Fallick AE, Allen CE, Bell MV, Dixon DR (2000) $d^{13}C$ values of lipids from phototrophic zone microplankton and bathypelagic shrimps at the Azores sector of the Mid-Atlantic Ridge. *Deep-Sea Res I* **47**: 121-136.

Ponsard J, Cambon-Bonavita MA, Zbinden M, Lepoint G, Joassin A, Corbari L, Shillito B, Durand L, Cueff-Gauchard V, Compère P (2013) Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J* **7**(1):96-109.

Powell MA, Somero GN (1983) Blood Components Prevent Sulfide Poisoning of Respiration of the Hydrothermal Vent Tube Worm *Riftia pachyptila*. *Science* **219**: 297-299.

Pradillon F, Le Bris N, Shillito B, Young CM, Gail F (2005) Influence of environmental conditions on early development of the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *J Exp Biol* **208**(Pt 8): 1551-61.

Prieur D, Erauso G, Jeanthon C (1995) Hyperthermophilic life at deep-sea hydrothermal vents. *Planetary and Space Science* **43**(1–2): 115-122.

Q

Quince C, Curtis TP, Sloan WT (2008) The rational exploration of microbial diversity. *ISME J* **2**(10): 997-1006.

R

Rader BA, Campagna SR, Semmelhack MF, Bassler BL, Guillemin K (2007) The quorum-sensing molecule autoinducer 2 regulates motility and flagellar morphogenesis in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **189**: 6109–6111.

Ranganathan S, Simpson KJ, Shaw DC, Nicholas KR (1999) The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *J. Mol. Graph. Model* **17**: 106-113.

Ravaux J, Gaill F, Le Bris N, Sarradin PM, Jollivet D, Shillito B (2003) Heat-shock response and temperature resistance in the deep-sea vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Biology* **206**: 2345-2354.

Ravaux J, Hamel G, Zbinden M, Tasiemski AA, Boutet I, Léger N, Tanguy A, Jollivet D, Shillito B. (2013) Thermal limit for metazoan life in question: in vivo heat tolerance of the Pompeii worm. *PLoS One* **8**(5): e64074.

Relf JM, Chisholm JR, Kemp GD, Smith VJ (1999) Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem* **264**: 350-357.

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.

Robidart JC, Bench SR, Feldman RA, Novoradovsky A, Podell SB, Gaasterland T et al. (2008). Metabolic versatility of the *Riftia pachyptila* endosymbiont revealed through metagenomics. *Environmental Microbiology* **10**: 727-737.

Rolland JL, Abdelouahab M, Dupont J, Lefevre F, Bachère E, Romestand B (2010) Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Mol. Immunol* **47**: 1269-1277.

Rona PA, Klinkhammer G, Nelsen TA, Trefry JH, Elderfield H (1986) Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge. *Nature* **321**(6065): 33-37.

Rona PA, Bogdanov YA, Gurvich EG, Rimski-Korsakov NA, Sagalevitch AM, Hannington MD, Thompson G (1993) Relict hydrothermal zones in the TAG hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge, 26°N, 45°W. *J. Geophys. Res.-Solid Earth* **98**: 9715-9730.

Rosa RD, Stoco PH, Barracco MA (2008) Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for anti-lipopolysaccharide factors (ALFs) in Brazilian palaemonid and penaeid shrimps. *Fish Shellfish Immunol* **25**: 693-696.

Rosa RD, Barracco MA (2010) Antimicrobial peptides in crustaceans. *ISJ*. **7**: 262-284.

Roussel EG, Sauvadet AL, Chaduteau C, Fouquet Y, Charlou JL, Prieur D, et al. (2009) Archaeal communities associated with shallow to deep subseafloor sediments of the New Caledonia Basin. *Environ Microbiol* **11**(9): 2446-2462.

Roussel EG, Konn C, Charlou J-L, Donval J-P, Fouquet Y, Querellou J, et al. (2011) Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. *Fems Microbiology Ecology* **77**(3): 647-665.

Ruby EG, Lee K-H (1998) The *Vibrio fischeri*-Euprymna scolopes Light Organ Association: Current Ecological Paradigms. *Appl Environ Microbiol* **64**: 805-812.

S

Salerno JL, Macko SA, Hallam SJ, Bright M, Won Y-J, McKiness Z et al. (2005) Characterization of Symbiont Populations in Life-History Stages of Mussels From Chemosynthetic Environments. *Biol Bull* **208**: 145-155.

Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol* **94**(3): 441–8.

Shiner E, Rumbaugh K, Williams S (2005) Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol* **29**:935-947.

Schmidt C, Le Bris N, Gaill F (2008a) Interactions of deep-sea vent invertebrates with their environment: The case of *Rimicaris exoculata*. *J Shellfish Res* **27**(1): 79-90.

Schmidt C, Vuillemin R, Le Gall C, Gaill F, Le Bris N (2008b) Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps. *Marine Chemistry* **108**(1-2): 18-31.

Segonzac M (1992) Les peuplements associés à l'hydrothermalisme océanique du Snake Pit (dorsale médio-Atlantique, 23°N, 3480 m): composition et microdistribution de la mégafaune. *C R Acad Sci III* **314**: 593-600.

Segonzac M, Desaintlaurent M, Casanova B (1993) Enigma of the trophic adaptation of the shrimp Alvinocarididae in hydrothermal areas along the Mid-Atlantic Ridge. *Cah Biol Mar* **34**: 535-571.

Sélosse MA (2000) La symbiose: structure et fonctions, rôle écologique et évolutif. *Vuibert, Paris, France*.

Sharp KH, Davidson SK, Haygood MG (2007) Localization of '*Candidatus* Endobugula sertula' and the bryostatins throughout the life cycle of the bryozoan *Bugula neritina*. *Isme J* **1**: 693-702.

Shillito B, Lubbering B, Lechaire JP, Childress JJ, Gaill F (1995) Chitin localization in the tube secretion system of a repressurized deep-sea tube worm. *J Struct Biol* **114**: 67-75.

Shillito B, Jollivet D, Sarradin PM, Rodier P, Lallier F, Desbruyeres D et al. (2001) Temperature resistance of *Hesiolyra bergi*, a polychaetous annelid living on deep-sea vent smoker walls. *Mar Ecol Prog Ser* **216**: 141-149.

Shillito B, Hamel G, Duchi C, Cottin D, Sarrazin J, Sarradin PM et al. (2008) Live capture of megafauna from 2300 m depth, using a newly designed Pressurized Recovery Device. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **55**: 881-889.

Sievert SM, Hügler M, Taylor CD, Wirsén CO (2008a) Sulfur Oxidation at Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Microbial Sulfur Metabolism, Springer Berlin Heidelberg*: 238-258.

Sievert SM, Scott KM, Klotz MG, Chain PSG, Hauser LJ, Hemp J, et al. (2008b) Genome of the Epsilonproteobacterial Chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol* **74**(4): 1145-1156.

Sifri CD (2008) Quorum Sensing: Bacteria Talk Sense. *Clin Infect Dis* **47**(8): 1070-6.

Singer E, Emerson D, Webb EA, Barco RA, Kuenen JG, Nelson WC, et al. (2011) *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1 the first genome of a marine Fe(II) oxidizing *Zetaproteobacterium*. *Plos One* **6**(9): e25386.

Singh RP, Baghel RS, Reddy CR, Jha B (2015) Effect of Quorum Sensing signals produced by seaweed-associated bacteria on carpospore liberation from *Gracilaria dura*. *Front Plant Sci* **6**:117.

Smith DC, Douglas AE (1987) The biology of symbiosis. *Edward Arnold, Baltimor*: 302 p.

- Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP (2001) IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol* **167**:366–74.
- Smith RS, Kelly R, Iglewski BH, Phipps RP (2002) The *Pseudomonas* autoinducer N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts: implications for inflammation. *J Immunol* **169**(5):2636-42.
- Smith VJ, Fernandes JM, Kemp GD, Hauton C (2008) Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev. Comp. Immunol* **32**: 758-772.
- Somboonwiwat K, Marcos M, Tassanakajon A, Klinbunga S, Aumelas A, Romestand B, et al (2005) Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol* **29**: 841-851.
- Somboonwiwat K, Bachère E, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A (2008) Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. *Dev. Comp. Immunol* **32**: 1170-1176.
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI (2004) Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nature Immunology* **5**: 569-573.
- Sotelo-Mundo RR, Islas-Osuna MA, de-la-Re-Vega E, Hernández-López J, Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G (2003) cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* **15**: 325-331.
- Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB (1999) Quorum Sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 15196–15201.
- Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15):8951-6.
- Sperstad SV, Haug T, Paulsen V, Rode TM, Strandskog G, Solem ST, et al. (2009a). Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Dev. Comp. Immunol* **33**: 583-591.
- Sperstad SV, Haug T, Vasskog T, Stensvåg K (2009b) Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Mol. Immunol* **46**: 2604-2612.
- Stabb EV, Ruby EG (2003) Contribution of *pilA* to Competitive Colonization of the Squid *Euprymna scolopes* by *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 820-826.
- Steinberg DA, Lehrer RI (1997) Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. *Methods Mol Biol* **78**: 169-86.
- Steindler L, Venturi V (2007). Detection of quorum-sensing N -acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett.* **266**:1-9.
- Subramoni S, Venturi V (2009) LuxR-family “solos”: bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology.* **155**: 1377-1385.

Sudarikov SM, Roumiantsev AB (2000) Structure of hydrothermal plumes at the Logatchev vent field, 14°45'N, Mid-Atlantic Ridge: evidence from geochemical and geophysical data. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* **101**(3-4): 245-252.

Sun YD, Fu LD, Jia YP, Du XJ, Wang Q, Wang YH, et al. (2008) A hepatopancreas specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol. Immunol* **45**: 348-361.

Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, Jitrapakdee S, Hirono I, Aoki T, et al. (2002) Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Mar. Biotechnol (NY)* **4**: 487-494.

Supungul P, Tang S, Maneeruttanarungroj C, Rimphanitchayakit V, Hirono I, Aoki T, et al. (2008) Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol* **32**: 61-70.

Surette MG, Miller MB, Bassler BL (1999) Quorum Sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1639-44.

Szafranski KM, Deschamps P, Cunha MR, Gaudron SM, Duperron S (2015) Colonization of plant substrates at hydrothermal vents and cold seeps in the northeast Atlantic and Mediterranean and occurrence of symbiont-related bacteria. *Front Microbiol* **6**: 162.

T

Tait K, Joint I, Daykin M, Milton DL, Williams P, Cámara M (2005) Disruption of Quorum Sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ Microbiol* **7**: 229-40.

Tait K, Havenhand J (2013) Investigating a possible role for the bacterial signal molecules N-acylhomoserine lactones in *Balanus improvisus* cyprid settlement. *Mol Ecol* **22**: 2588-602.

Takai K, Suzuki M, Nakagawa S, Miyazaki M, Suzuki Y, Inagaki F, et al. (2006) *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the *Epsilonproteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(8): 1725-1733.

Tanaka S, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S (1982) Limulus anti-LPS factor: An anti-coagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of Limulus coagulation system. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **105**: 717-723.

Tasiemski A, Jung S, Boidin-Wichlacz C, Jollivet D, Cuvillier-Hot V, Pradillon F, Vetriani C, et al. (2014) Characterization and function of the first antibiotic isolated from a vent organism: the extremophile metazoan *Alvinella pompejana*. *PLoS One*. **9**(4): e95737.

Tassanakajon A, Amparyup P, Somboonwiwat K, Supungul P (2011) Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp. *Mar. Biotechnol. (NY)* **12**(5):487-505

Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, Standiford TJ, Ishiguro M, Yamaguchi K (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun.* **71**: 5785-93.

Teather RM, Wood PJ (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **43**(4): 777-780.

Teixeira S, Cambon-Bonavita MA, Serrao EA, Desbruyeres D, Arnaud-Haond S (2011) Recent population expansion and connectivity in the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* along the Mid-Atlantic Ridge. *Journal of Biogeography* **38**: 564-574.

Teixeira, S, Serrão EA, Arnaud-Haond S (2012) Panmixia in a Fragmented and Unstable Environment: The Hydrothermal Shrimp *Rimicaris exoculata* Disperses Extensively along the Mid-Atlantic Ridge. *Plos One* **7**(6): e38521.

Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby P, Sewell H, et al. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* **66**(1): 36-42.

Teske A, Hinrichs KU, Edgcomb V, de Vera Gomez A, Kysela D, Sylva SP, Sogin ML, Jannasch HW (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol* **68**(4): 1994-2007.

Tharntada S, Somboonwiwat K, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A (2008) Anti-lipopolysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, are encoded by two genomic loci. *Fish Shellfish Immunol* **24**: 46-54.

Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS (2004) Coagulation in arthropods: defense, wound closure and healing. *Trends Immunol* **25**: 289-294.

Tivey MK, Humphris SE, Thompson G, Hannington MD, Rona PA (1995) Deducing patterns of fluid flow and mixing within the TAG active hydrothermal mound using mineralogical and geochemical data. *J. Geophys. Res* **100**(B7): 12527-12555.

Tyler PA, Young CM (1999) Reproduction and dispersal at vents and cold seeps. *J Mar Biol Assoc UK* **79**: 193-208.

V

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.

Van Dover CL (2000) The ecology of deep-sea hydrothermal vents. *Princeton Univ Pr.*

van Gylswyk NO. (1990) Enumeration and presumptive identification of some functional groups of bacteria in the rumen of dairy cows fed grass silage-based diets. *FEMS Microbiology Letters* **73**(3): 243-261.

van Rhijn P, Vanderleyden J. (1995) The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews* **59**(1): 124-142.

Veliz-Vallejos DF, van Noorden GE, Yuan M, Mathesius U (2014) A *Sinorhizobium meliloti*-specific N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signal increases nodule numbers in *Medicago truncatula* independent of autoregulation. *Front Plant Sci* **5**: 551.

Venturi V, Fuqua C (2013) Chemical signaling between plants and plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 17-37.

Vereshchaka AL, Kulagin DN, Lunina AA (2015) Phylogeny and New Classification of Hydrothermal Vent and Seep Shrimps of the Family Alvinocarididae (Decapoda). *PLoS One* **10**;10(7): e0129975.

Vigneron A, Cruaud P, Pignet P, Caprais JC, Cambon-Bonavita MA, Godfroy A, Toffin L (2013) Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME J* **7**(8): 1595-608.

Vigneron A, Cruaud P, Pignet P, Caprais JC, Gayet N, Cambon-Bonavita MA, Godfroy A, Toffin L (2014) Bacterial communities and syntrophic associations involved in anaerobic oxidation of methane process of the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin. *Environ Microbiol* **16**(9): 2777-90.

Visick KL, Ruby EG (2006) *Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 632-638.

Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology* **11**:57-168.

von Cosel R, Comtet T, Krylova E (1999) *Bathymodiulus* (*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 (2000) Chemistry of hydrothermal vent fluids from 9°-10°N, East Pacific Rise: "Time zero" the immediate post-eruptive period. *J. Geophys. Res* **105**(B5): 11203-11222.

W

Watabe H, Hashimoto J (2002) A New Species of the Genus *Rimicaris* (Alvinocarididae: Caridea: Decapoda) from the Active Hydrothermal Vent Field, "Kaiei Field," on the Central Indian Ridge, the Indian Ocean. *Zoological Science* **19**(10): 1167-1174.

Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-46.

Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol* **182**(10): 2675-9.

Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**(2):697-703.

West N, Adams D (1997). Phenotypic and Genotypic Comparison of Symbiotic and Free-Living Cyanobacteria from a Single Field Site. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4479-4484.

Williams AB, Rona PA (1986) Two New Caridean Shrimps (Bresiliidae) from a Hydrothermal Field on the Mid-Atlantic Ridge. *J Crust Biol* **6**: 446-462.

Wolff T (1970) The concept of the hadal or ultra-abyssal fauna. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* **17**(6): 983-1003.

Wolff T (2005) Composition and endemism of the deep-sea hydrothermal vent fauna. *Cahiers De Biologie Marine* **46**: 97-104.

Wu L, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen L, Kohler JE, Patel N, et al. (2005). Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **309**: 774-777.

X

Xavier KB, Bassler BL (2003) LuxS Quorum Sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol* **6**: 191-197.

Xing Y, Feng-Ying G, Qing-Mei Z, Jun-Jie B, Huan W, Hai-Hua L, et al. (2009) Cloning and characterization of the tiger shrimp lysozyme. *Mol. Biol. Rep* **36**: 1239

Y

Yamamoto M, Nakagawa S, Shimamura S, Takai K, Horikoshi K (2010) Molecular characterization of inorganic sulfur-compound metabolism in the deep-sea epsilonproteobacterium *Sulfurovum* sp. NBC37-1. *Environ Microbiol* **12**(5): 1144-1153.

Yang Y, Poncet J, Garnier J, Zatylny C, Bachère E, Aumelas A (2003) Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem* **278**: 36859-36867.

Yang SJ, Oh HM, Chung S, Cho JC (2009) *Antarcticimonas flava* gen. nov., sp. nov., isolated from Antarctic coastal seawater. *J Microbiol* **47**(5): 517-23.

Yedery RD, Reddy KV (2009a) Identification, cloning, characterization and recombinant expression of an anti-lipopolysaccharide factor from the hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol* **27**: 275-284.

Yip ES, Geszvain K, DeLoney-Marino CR, Visick KL (2006) The symbiosis regulator RscS controls the *syp* gene locus, biofilm formation and symbiotic aggregation by *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology* **62**: 1586-1600.

Yue F, Pan L, Miao J, Zhang L, Li J (2010) Molecular cloning, characterization and mRNA expression of two antibacterial peptides: crustin and anti-lipopolysaccharide factor in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Comp. Biochem. Physiol* **156B**: 77-85.

Z

Zachary A, Colwell RR (1979) Gut-associated microflora of *Limnoria tripunctata* in marine creosote-treated wood pilings. *Nature* **282**: 716-717.

Zachary A, Parrish KK, Bultman JD (1983) Possible Role of Marine-Bacteria in Providing the Creosote-Resistance of *Limnoria Tripunctata*. *Marine Biology* **75**(1): 1-8.

Zaidman-Rémy A, Hervé M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, et al. (2006) The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* **24**(4): 463-73.

Zal F, Suzuki T, Kawasaki Y, Childress JJ, Lallier FH, Toulmond A (1997) Primary structure of the common polypeptide chain b from the multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*: an insight on the sulfide binding-site. *Proteins* **29**(4): 562-74.

Zbinden M, Cambon-Bonavita MA (2003) Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol Ecol* **46**: 23-30.

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

Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, de Montlaur CD, Roussel E, Guyot F et al. (2008) New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J Exp Mar Biol Ecol* **359**: 131-140.

Zhao XF, Wang JX (2008). Antimicrobial peptides of the immune response of shrimp. *ISJ* **5**: 162-179.

Zhang X, Huang C, Qin Q (2004) Anti-viral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Res* **61**: 93-99.

Zhang J, Li F, Wang Z, Xiang J (2007) Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J. Biotechnol* **127**: 605-614.

Zimmermann S, Wagner C, Müller W, Brenner-Weiss G, Hug F, Prior B, Obst U, Hänsch GM (2006) Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect Immun* **74**(10): 5687-92.

Mode de reconnaissance hôte-symbionte en milieux extrêmes : cas du modèle symbiotique, la crevette *Rimicaris exoculata*

Simon LE BLOA

Résumé : Les sources hydrothermales océaniques profondes renferment des écosystèmes extrêmes, situés dans la zone abyssale des Océans. Dans ces environnements dépourvus de lumière, la production primaire est réalisée par la chimiosynthèse microbienne. Ces milieux sont colonisés par des espèces animales, dont la plupart vivent en associations plus ou moins fortes avec des micro-organismes. La crevette *Rimicaris exoculata* est une espèce hydrothermale endémique des sites de la Ride-Médio-Atlantique (MAR), qui domine la plupart des sites qu'elle colonise. Ce crustacé a pour particularité de posséder deux communautés symbiotiques : une située dans son céphalothorax hypertrophié et une inféodée à son tractus digestif. Tout d'abord, ce travail de thèse s'est concentré sur l'étude de la communication bactérienne (Quorum Sensing ou QS) au sein des communautés ectosymbiotiques de *R. exoculata* au cours de son cycle de mue et de vie. Ensuite, ce travail s'est focalisé sur l'identification d'un peptide antimicrobien (PAM), puis à rechercher sa fonction dans l'immunité et le contrôle des symbiotes chez *Rimicaris exoculata*. Ce travail a permis, d'une part, de confirmer la présence de deux gènes du QS (*luxS* et *luxR*) dans les communautés ectosymbiotiques de *R. exoculata* sur quatre sites hydrothermaux : Rainbow, TAG, Snake Pit et Logatchev. Ces gènes étant plus divergents que ceux de l'ARNr 16S, leur utilisation comme marqueurs génétiques biogéographiques pour retracer l'origine des individus est discuté. Ce travail a permis, d'autre part, d'identifier pour la première fois un PAM (sus nommé *Re-crustin*), chez un arthropode hydrothermal. Les données suggèrent une participation de ce PAM dans le contrôle de l'ectosymbiose. L'ensemble de ces travaux apporte de nouvelles hypothèses sur l'interaction entre les épibiontes du céphalothorax et la crevette *Rimicaris exoculata*.

Mots clés : écosystèmes hydrothermaux, *Rimicaris exoculata*, symbiose, Quorum Sensing, peptide antimicrobien, marqueurs génétiques.

Toward a better understanding of the symbiotic relationships in *Rimicaris exoculata* model

Abstract : Deprived of light, the deep-sea hydrothermal vents are extremes ecosystems sustained by microbial chemosynthesis. These environments are colonized by animal species living in close relationships with these chemoautotrophic micro-organisms, eating them or establishing long term interactions with them, may they be trophic or not only. The shrimp *Rimicaris exoculata* is an endemic hydrothermal species of the Mid-Atlantic Ridge (MAR) sites. This crustacean represents the predominant macrofauna of some sites of the MAR. It lives in symbiotic association with two distinct microbial communities qualified as ectosymbiosis. One is located in its gill chamber and one in its gut. First, this work focused on the study of bacterial communication (Quorum Sensing or QS) within the ectosymbiotic communities during the molting and life cycles of *R. exoculata*. Then, we focused on an antimicrobial peptide (AMP) identification and search for its function in *R. exoculata* immunity and in controlling symbionts. Two QS genes (*luxS* and *luxR*) were identified in the *R. exoculata* ectosymbiotic community at different shrimp molt stages and life stages at the Rainbow, TAG, Snake Pit and Logatchev vent sites. As these genes are more divergent than that of 16S rRNA, they could be then used as biogeographical genetic markers tools to trace back the origin of individuals to a location or between locations along its life cycle. This work reports also the first description of an AMP in an extremophile arthropod (namely *Re-crustin*). Data suggest a participation of this AMP in the control of the ectosymbiosis in *Rimicaris exoculata*. All this work provides new hypotheses which are discussed in the manuscript, dealing with the interaction between symbionts and *Rimicaris exoculata*.

Key words : hydrothermal vent, *Rimicaris exoculata*, symbiose, Quorum Sensing, antimicrobial peptide, genetic marker.