

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Ecole Doctorale
Diversité du Vivant (ED 392)

Présentée par
M. Terry BRISSAC

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
Microbiologie et Interactions durables

*Nature, Diversité et Spécificité de l'Association
Lucinidae / Bactéries sulfo-oxydantes.*

Soutenue publiquement le 01 octobre 2009 devant le jury composé de :

Dr. Nicole DUBILIER, Head of Symbiosis Group, Max Planck, Bremen

Pr. Olivier GROS, Prof. Univ. Antilles-Guyane

Pr. Vincent MARECHAL, Prof. Univ. Paris VI

Dr. Hervé MERÇOT, CR, HDR, CNRS, Univ. Paris VI

Dr. Christine PAILLARD, CR, HDR, CNRS, IUEM, Brest

Dr. Guennadi SEZONOV, MCU, HDR, Univ. Paris VI

Dr. Fabrice VAVRE, CR, HDR, CNRS, Univ. Lyon 1

Examinatrice

Co-directeur

Examinateur

Directeur

Rapporteuse

Examinateur

Rapporteur

UMR 7138 UPMC - CNRS – MNHN - IRD

« **Systématique, Adaptation, Evolution** »

Equipe : « Génétique & Evolution »

Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

7, quai St Bernard

75252 PARIS CEDEX 05

REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Hervé Le Guyader de m'avoir accueilli dans son unité.

Je remercie Christine Paillard et Fabrice Vavre qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Nicole Dubilier, Vincent Maréchal et Guennadi Sezonov pour leur présence au sein de mon jury.

Je tiens aussi à remercier Françoise Gaill et à renouveler mes remerciements à Christine et Guennadi pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Leurs questions et conseils lors des différentes réunions m'ont ainsi permis de prendre du recul et d'avoir une autre vision de mon sujet.

Je remercie bien sûr mes deux directeurs de thèse, Hervé et Olivier.

Hervé qui me suit depuis maintenant cinq ans, avec qui les discussions scientifiques ont quelques fois été longues et douloureuses, m'a permis de progresser et ce surtout dans la rédaction et la présentation. J'ai grâce à lui acquis l'expérience nécessaire pour mener à bien ma quête scientifique.

*Olivier qui malgré la distance géographique et le décalage horaire a toujours été disponible et de bon conseil, rendant par la même mon travail aussi plaisant à Paris qu'en Guadeloupe. Merci pour ton expertise sur les *Lucinidae* et de m'avoir laissé toute latitude dans l'orientation de mon travail, et le test de mes hypothèses aussi farfelues soient-elles.*

Je tiens à remercier Dominique Hiquet, chef d'équipe, président d'EURO-DH et tant d'autres qui malgré un emploi du temps surchargé a toujours été présent pour discuter, échanger et surtout réfléchir aux résultats et à l'avenir. J'espère ne pas t'avoir trop fait te servir de ton tampon et suis sûr que tu continueras à en faire bon usage.

Je voudrais remercier Eric Bonnivard pour son aide et ses conseils manips ou autre ; Un grand merci pour la mèche porte-bonheur qui aurait pu débloquer SAS, MS et PCR en tout genres.

Je remercie Clémentine Vitte et Denis Poinsot, relecteurs bilingues sans qui, compte tenu de mon anglais, publier se serait révélé être une tâche nettement plus difficile.

Je remercie aussi les autres thésards côtoyés durant cette période Anna et Yves qui dans leur rôle d'anciens m'ont beaucoup apporté par leur partage de l'expérience de la thèse (vous ne pourrez plus m'appeler « petit thésard » désormais) ; Etienne, Vincent et bien sûr Mathieu (co-fondateur d'EURO-DH) sans qui déprimer aurait sûrement été moins « fun », le « jukebox musical » moins

varié et flécher les pièces manips plus long. Il faut maintenant te remettre d'aplomb car il va y avoir beaucoup de choses à fêter et car tu seras maintenant seul pour « sniper » Eric & Dominique.

Je voudrais remercier Paula toujours souriante et de bonne humeur qui apporte ce brin de folie et de joie rendant les journées de travail plus légères. Merci aussi pour toute l'aide que tu fournis pour la préparation du grand jour.

Je remercie les autres membres de l'équipe « Génétique & Evolution », Micheline « ça va les jeûnes », Denis notre ACMO (Agent Chargé de la Manutention d'Objets ou déménageur), Guillaume, Isabelle, Pierre et Sophie qui même si la géographie « Paris-6-enne » (tout du moins avant ces 2 derniers mois) nous a éloignés ont bien voulu m'écouter lors de mes nombreuses répétitions et répondre à mes interrogations.

Je remercie Eric Baptiste pour les discussions sur la congruence et autres déboires phylogénétiques.

Je remercie Catherine Ozouf-Costaz et Jean-Pierre Coutanceau qui ont accompagné mes premières pérégrinations dans le monde du FISH.

Je remercie Danielle Merkjled et Philippe Leballeur sans qui la gestion des tâches administratives (et bien plus encore) serait plus difficile, toujours disponibles et efficace pour régler tous les problèmes.

Je remercie également les Membres de l'équipe « Symbiose » Sylvie, Jean-Luc pour leur accueil lors des 2 missions scientifiques (j'insiste) que j'ai effectuées en Guadeloupe ; mais aussi les doctorants Amandine, Leslie, Melina, Nathalie, Jean-Marie, Pedro, Sophie et Yann.

Je remercie les membres de l'équipe « Répression épigénétique et éléments transposables », Anne-Laure (même si elle n'en fait plus partie), Augustin, Laure, Stéphane et Valérie, les voisins de la fameuse Tour42, pour leur présence, écoute et tout ce qui s'en suit.

Également un grand merci aux amis, Anna, Arnaud, Aurelia, François, Guillaïn (deux fois merci pour toi), Magali, Orso, Sandra, Alexandre et Nicolas (la pipoteam toujours vivante !) et ceux que j'aurais oublié (navré) pour les soirées, les pots et tous les petits moments passés à parler de tout de rien, bref à profiter de la vie.

Je tiens également à remercier le club de foot des « Suprêmes Béliers », soupapae de sécurité après les semaines « ras-le-bol ».

Je souhaiterais également et surtout remercier mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans tous mes projets, cette réussite leur appartient tout autant.

Merci aussi à ma tante Nicole qui a permis mon adaptation rapide après mon arrivée de Guadeloupe.

Et bien sûr et surtout Clémentine, toi qui as été mon premier soutien dans les moments difficiles, c'est aussi grâce à toi que j'ai pu en arriver là. Il y a tant à dire sur ce que tu as fait (et continue à faire) que je ne te remercierais jamais assez.

Enfin merci à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réussite de cette thèse, sans oublier les palourdes qui en torturant ces pauvres bactéries ont permis l'émergence de ce manuscrit.

TABLE DES MATIERES

<i>REMERCIEMENTS</i>	<i>3</i>
<i>TABLE DES MATIERES</i>	<i>7</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>9</i>
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	<i>11</i>
<i>RESUME</i>	<i>15</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>21</i>
<i>LA SYMBIOSE</i>	<i>21</i>
<i>LES ASSOCIATIONS CHIMIOAUTOTROPHES</i>	<i>26</i>
Diversité des hôtes	26
Diversité des symbiotes	27
Diversité métabolique	27
Diversité d' « infection »	28
<i>LES LUCINIDAE</i>	<i>30</i>
<i>LES LUCINIDAE</i>	<i>30</i>
<i>NATURE DE L'ASSOCIATION</i>	<i>41</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>41</i>
<i>DEMARCHE EXPERIMENTALE</i>	<i>43</i>
<i>RESULTATS</i>	<i>45</i>
<i>DISCUSSION</i>	<i>47</i>
<i>CONCLUSION</i>	<i>50</i>
<i>DIVERSITE BACTERIENNE</i>	<i>57</i>
<i>DIVERSITE INTERSPECIFIQUE</i>	<i>57</i>
<i>DEMARCHE EXPERIMENTALE.</i>	<i>60</i>
<i>EVOLUTION DES COUPLES SYMBIOTIQUES</i>	<i>64</i>

<i>DIVERSITE INTRA-SPECIFIQUE.</i>	71
<i>RECHERCHE DE MARQUEURS DE DIVERSITE.</i>	73
<i>DEMARCHE EXPERIMENTALE.</i>	75
<i>RESULTATS</i>	82
<i>DISCUSSION</i>	91
<i>SPECIFICITE D'ASSOCIATION</i>	101
<i>DISCUSSION GENERALE</i>	109
<i>NATURE DE LA RELATION</i>	111
<i>UNE NOUVELLE VISION DE L'ASSOCIATION</i>	112
<i>LUCINIDAE/BACTERIES SULFO-OXYDANTES.</i>	112
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	117
<i>ANNEXE 1 : STRUCTURE DES BRANCHIES DE LUCINIDAE</i>	131
<i>ANNEXE 2 : LISTE DES BACTERIES UTILISEES DANS LE CADRE DE LA RECHERCHE DE MARQUEURS.</i>	132
<i>ANNEXE 3: PROFIL « SVARAP » DU GENE DNAE.</i>	134
<i>ANNEXE 4 : TECHNIQUES PARTICULIERES UTILISEES.</i>	135
<i>ARTICLE 1 : BRISSAC ET AL. (2009)</i>	139
<i>ARTICLE 2 : BRISSAC ET AL.</i>	149
<i>ARTICLE 3 : BRISSAC ET AL.</i>	171
<i>DISCUSSION</i>	178

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique de la taxonomie des bivalves chimiosymbiotiques.	30
Figure 2 Diversité de formes chez les Lucinidae.	31
Figure 3. Habitat typique des Lucinidae.	32
Figure 4. Mangrove de palétuviers, <i>Rhizophora mangle</i>	32
Figure 5. Herbier à <i>Thalassia testudinum</i>	32
Figure 6. Anatomie générale des Lucinidae.	33
Figure 7. Représentation schématique de la transmission environnementale.	41
Figure 8. Analyse des différentes sous-populations bactériennes retrouvées dans les branchies de divers individus de l'espèce <i>Codakia orbicularis</i>	42
Figure 9. Recherche de symbiotes re-largués.	46
Figure 10. Suivi de la population symbiotique à l'intérieur des branchies.	47
Figure 11. Représentation schématique du recrutement environnemental.	50
Figure 12. Carte présentant les lieux d'échantillonnage des différentes espèces de Lucinidae analysées.	61
Figure 13. Phylogénie moléculaire des Lucinidae réalisée après concaténation des séquences des ARNs ribosomiaux 18S et 28S (1252 sites).	65
Figure 14. Phylogénie moléculaire des symbiotes chimioautotrophes réalisée grâce aux séquences d'ARNr 16S (1269 sites).	67
Figure 15. Phylogénie moléculaire des symbiotes chimioautotrophes réalisée grâce aux séquences d'APS Réductase (273 sites).	68
Figure 16. Exploration des bases de données.	74
Figure 17. Carte des zones échantillonnées pour l'analyse de la diversité intra-spécifique.	76
Figure 18. Indice de variabilité inter-spécifique des différents gènes candidats comparés à celui de l'ARNr 16S.	84
Figure 19. Indice de variabilité intra-spécifique des différents gènes candidats comparés à celui de l'ARNr 16S pour différentes souches d' <i>Escherichia coli</i> et de <i>Legionella pneumophila</i>	85
Figure 20. Phylogénie moléculaire des bactéries basée sur des séquences d'ARN ribosomal 16S (1354 sites). .	86
Figure 21. Phylogénies moléculaires des bactéries basées sur des séquences des différents marqueurs candidats (<i>dnaE</i> : 1630 sites ; <i>groEL</i> : 1521 ; <i>recA</i> : 906 ; <i>gyrB</i> : 1473 ; <i>polA</i> : 2059 ; <i>rpoB</i> : 2604).	87
Figure 22. Phylogénie moléculaire des Lucinidae réalisée après concaténation des séquences des ARNs ribosomiaux 18S et 28S (1386 sites).	89
Figure 23. Réseaux d'haplotypes reconstruits à partir des séquences obtenues pour chacun des marqueurs	90
Figure 24. Représentation schématique de la distribution des hôtes et des symbiotes dans les sédiments des herbiers à <i>T. testudinum</i>	96
Figure 25. Représentation schématique du processus évolutif pouvant conduire à la structuration de la diversité bactérienne observée dans les herbiers à <i>T. testudinum</i> de l'Îlet Cochon.	99
Figure 26. Représentation schématique du choix du partenaire.	100

<i>Figure 27. Hypothèses de contrôle de l'acquisition du symbiote par l'hôte selon (Gros et al., 2003a).....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 28. CARD-FISH réalisé à l'aide de la sonde Symco2A.</i>	<i>106</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau A. Différents types de relations entre espèces en fonction de l'effet de l'interaction sur le succès reproducteur des partenaires.</i>	<i>24</i>
<i>Tableau B. Echantillonnage de Distel et al. (1994; 1988).</i>	<i>59</i>
<i>Tableau C. Echantillonnage de Durand et al. (1996) ; Durand & Gros (1996) ; Gros et al. (2000; 2003a).....</i>	<i>59</i>
<i>Tableau D. Echantillonnage réalisé pour cette étude de la diversité des symbiotes de Lucinidae</i>	<i>62</i>
<i>Tableau E. Amorces et conditions de PCR utilisées dans cette étude.</i>	<i>63</i>
<i>Tableau F. Matrice d'identité réalisée en « pairwise deletion » utilisant les séquences d'ARNr 16S.</i>	<i>69</i>
<i>Tableau G. Gènes-candidats retenus à partir de la littérature.</i>	<i>77</i>
<i>Tableau H. Amorces utilisées au cours de l'étude de la diversité intra-spécifique.</i>	<i>81</i>
<i>Tableau I. Résultats de l'Au-test.</i>	<i>83</i>
<i>Tableau J Analyse du polymorphisme.</i>	<i>91</i>

RESUME

RESUME

Les associations entre « invertébrés » marins et bactéries chimioautotrophes (*i.e.* capable de fixer le carbone à partir de composés inorganiques) présentent une grande diversité tant au niveau taxonomique, métabolique qu'écologique. Dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressé aux Lucinidae, famille de bivalves qui héberge dans des cellules spécialisées de leurs branchies (les bacteriocytes), des gamma-protéobactéries endosymbiotiques, thioautotrophes (*i.e.* sulfo-oxydantes). Mon travail a porté sur l'étude : (i) de la nature réelle de cette association, (ii) de la diversité génétique des symbiotes associés et de la spécificité du couple hôte/symbiote.

(i) Ces associations sont essentiellement décrites dans la littérature comme mutualistes (*i.e.* avantageuses pour les deux partenaires). La nature des associations symbiotiques étant souvent lié au mode de transmission du symbiote, l'hypothèse mutualiste est recevable dans les cas où le symbiote est transmis verticalement (*e.g.* Vesicomidae). Cependant, certains arguments peuvent conduire à une hypothèse alternative pour les modèles dits à « transmission environnementale ». Ce mode de transmission suppose un passage du symbiote de la génération parentale à la suivante *via* l'environnement. Ce schéma implique donc la multiplication du symbiote dans l'hôte, son relargage par ce dernier et la présence de la forme libre du symbiote dans l'environnement. Après analyse, il apparaît qu'il n'y a ni multiplication ni relargage du symbiote chez les Lucinidae. Cette association ne serait donc pas mutualiste, l'entrée en symbiose constituant ainsi pour la bactérie une impasse évolutive.

(ii) L'analyse de la diversité des symbiotes indique que les couples actuels ne proviennent pas de la co-évolution des deux partenaires à partir d'une symbiose ancestrale. En effet, au sein de 18 espèces hôtes analysées seules 3 espèces bactériennes ont pu être décrites, l'espèce majoritaire étant hébergée par des hôtes colonisant les herbiers et les deux autres par des espèces de mangrove. L'association semble donc être labile et se constituer en fonction de l'environnement. Cependant, une analyse MLST a révélé l'existence d'une diversité symbiotique intra-spécifique. Cette diversité de souches serait structurée au sein d'une même localité en fonction des hôtes présents. Ceci indiquerait une spécificité d'association souche bactérienne/espèce hôte qui pourrait être due à des processus évolutifs de type « Red Queen ». Une expérience d'infection croisée réalisée entre *Codakia orbicularis* et *C. orbiculata* atteste de cette spécificité d'association. Il semble néanmoins qu'une certaine plasticité puisse intervenir au cours du stade juvénile de l'hôte.

Les résultats de mon travail de thèse supportent l'hypothèse que l'association Lucinidae/bactéries sulfo-oxydantes ne serait pas mutualiste. L'association ne se constituerait qu'en faveur de l'hôte et selon un modèle d'évolution antagoniste. Le modèle Lucinidae présente de nombreux points communs avec certains modèles hydrothermaux ou de suintements froids traditionnellement considérés comme mutualistes à transmission environnementale. Dès lors se pose naturellement la question de l'extension de nos conclusions à ces modèles profonds.

*« Tout est pour le mieux dans le
meilleur des mondes possibles »*

(Dr Pangloss ; Candide, Voltaire)

Pas si sûr...

INTRODUCTION

INTRODUCTION

LA SYMBIOSE

Le terme même de symbiose, tel qu'il a été défini par Anton De Bary en 1879, englobe « toute association étroite et durable entre deux organismes hétérosécifiques ». De fait, aussi bien le mutualisme (où les bénéfices sont réciproques pour les deux partenaires) ou à l'inverse le parasitisme (association à bénéfice unilatéral) en passant par le commensalisme (relation bénéfique pour un partenaire et sans incidence sur l'autre) sont des symbioses. Cependant le terme « symbiose » est souvent assimilé de façon restrictive aux seules relations à bénéfices mutuels. Dans la suite de ce manuscrit, le terme de symbiose sera employé suivant la définition initiale de De Bary.

Ces associations d'êtres vivants hétérosécifiques mais nécessairement compatibles (afin que l'association puisse d'une part se constituer et d'autre part durer) constituent un des facteurs majeurs dans l'évolution des espèces. Les associations entre organismes eucaryotes typiquement hétérotrophes (source de carbone organique) avec des microorganismes autotrophes (source de carbone inorganique) illustrent très bien ce dernier point. L'association de caractéristiques métaboliques ou physiologiques différentes permet ainsi l'expression d'un potentiel nouveau en réponse à l'environnement. Cette dernière permet à l'hôte¹ de mieux exploiter sa niche écologique ou d'en exploiter une nouvelle. Le symbiote quant à lui, trouve dans cet hôte un nouvel environnement où son succès reproducteur est accru (*e.g.* protection, meilleures conditions de reproduction, meilleure transmission).

Les modifications génotypiques, phénotypiques ou comportementales observées chez certaines espèces sont autant de preuves qui attestent du caractère évolutif de ces associations. On retrouve ainsi au niveau génotypique la réduction des génomes bactériens (pour revue, voir Delmotte *et al.*, 2006; Gomez-Valero *et al.*, 2007; McCutcheon *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009) qui correspond à la perte de régions génomiques ou à la perte de gènes codants pour des fonctions devenues inutiles ou non essentielles du fait de l'association. Autre cas, celui

¹ D'une façon générale et par commodité, au sein des associations symbiotiques le plus gros partenaire est nommé hôte et le plus petit symbiote.

INTRODUCTION

des transferts de gènes entre symbiote et hôte (Blaxter, 2007). C'est l'exemple de l'association entre le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* et la gamma-protéobactérie *Buchnera aphidicola* (Gil *et al.*, 2004; Nikoh and Nakabachi, 2009). Cette bactérie possède en effet l'un des plus petits génomes connus (entre 420 et 650kb contenant de 400 à 600 gènes). En dépit de la perte de gènes bactériens essentiels, cette bactérie survit grâce à l'intégration et surtout à l'expression de ces gènes transférés au génome de l'hôte (Nikoh and Nakabachi, 2009). D'autres modifications génotypiques sont retrouvées essentiellement dans les relations de type parasitaire. En effet, dans ce type de relations où le parasite « veut s'installer » et l'hôte « lui échapper » nombre de modifications se produisent et sont sélectionnées. Ainsi va la « sélection des meilleurs¹ parasites par les hôtes et la sélection des meilleurs hôtes par les parasites » (Combes, 2003). Dans ces modèles, les « gènes pour se rencontrer » chez le parasite et les « gènes pour s'éviter » chez l'hôte évoluent de façon antagoniste tout comme les « gènes pour tuer » et les « gènes pour survivre ». Les deux partenaires évoluent ainsi sans cesse dans une sorte de course aux armements² (Van Valen, 1973) où le plus important est le succès reproducteur (fitness). Enfin, l'accélération du taux d'évolution moléculaire des endosymbiotes transmis verticalement constitue un autre exemple de modification génotypique liée à la symbiose. Dans ces modèles, l'effet de la dérive génétique est amplifié par l'existence de goulots d'étranglements au moment de la transmission des symbiotes (Peek *et al.*, 1998b; Woolfit and Bromham, 2003).

Au niveau phénotypique, différentes situations peuvent se présenter. Il peut s'agir de : (i) l'apparition de cellules spécialisées tels que les bactériocytes des bivalves (Fisher, 1990) ou des insectes (Buchner, 1965), (ii) la formation d'organes spécialisés dans la culture des symbiotes comme l'organe lumineux du calmar *Euprymna scolopes* (Boettcher and Ruby, 1990; McCann *et al.*, 2003) ou les nodules dans le cas de l'association *Rhizobium*/Légumineuses (Beringer *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 2007), (iii) la modification des organes ou tissus de l'hôte telle que la réduction du tractus digestif (Fisher, 1990).

Enfin, au niveau comportemental, certains parasites sont capables de « médier » le comportement de leur hôte de façon à faciliter leur transmission ou leur accès à différentes ressources. Ainsi, chez la palourde *Venerupis aurea*, hôte intermédiaire de *Meiogymnophallus fossarum*, la présence du parasite induit chez ce bivalve un changement d'orientation dans les

¹ On entend ici par meilleur, le partenaire capable d'évoluer pour ne pas disparaître.

² Ce processus évolutif correspond à la théorie de la Reine Rouge proposée par Leigh Van Valen .

sédiments. Ceci a pour effet de rendre la palourde plus accessible à son prédateur *Haematopus ostragalus* qui est l'hôte final du parasite (Bartoli, 1978). Ces dernières modifications ont été décrites sous le nom de phénotype étendu¹ (Dawkins, 1982).

Enfin, l'exemple le plus remarquable de l'importance évolutive de ces associations symbiotiques reste l'origine bactérienne de certains organites de la cellule eucaryote tels que les mitochondries (anciennes alpha-protéobactéries) ou les chloroplastes (anciennes cyanobactéries) (Margulis and Fester, 1991).

Entre mutualisme et parasitisme il existe différentes relations plus ou moins néfastes ou bénéfiques pour chacun des partenaires (Tableau 1). Cependant, il existe des cas où la nature des relations symbiotiques reste difficile à définir tant les bénéfices ou les coûts pour les partenaires sont parfois subtils à déterminer. Ces avantages ou désavantages sont généralement définis en fonction de l'effet de l'association sur le succès reproducteur des deux partenaires.

La transmission du symbiote constitue également un élément essentiel à prendre en compte. Cette dernière constitue à priori la pierre angulaire de toute association symbiotique. En effet, le passage du symbiote d'une génération à l'autre permet la persistance de l'association au cours du temps. Cette transmission peut être (i) verticale : passage du symbiote de la génération parentale à la génération fille *via* les gamètes (donc entre individus directement apparentés) (ii) horizontale : échange de symbiotes (via un vecteur ou non) entre individus contemporains apparentés ou non, (iii) environnementale. Ce dernier terme qui correspond en tous points à une transmission horizontale est restreint aux cas où l'association symbiotique est nécessaire à l'hôte. Dans ce cadre elle définit l'infection d'une nouvelle génération hôte par un stock de symbiotes présent dans l'environnement et provenant de la génération parentale (Le Pennec *et al.*, 1988).

La nature des associations symbiotiques est souvent liée au mode de transmission du symbiote. Communément, la transmission verticale est caractéristique des associations de type mutualiste. En effet, le devenir du symbiote dépend du devenir de son hôte et inversement. A l'inverse, la transmission horizontale est le mode de transmission typique des organismes pathogènes.

¹ Ce concept correspond à l'expression du génotype d'un partenaire dans le phénotype de l'autre, ou comment les gènes d'un symbiote induisent des modifications morphologiques ou comportementales chez un hôte.

INTRODUCTION

Tableau A. Différents types de relations entre espèces en fonction de l'effet de l'interaction sur le succès reproducteur des partenaires.

		Effet sur la fitness du partenaire 1		
		Positif	Neutre	Négatif
Effet sur la fitness du partenaire 2	Positif		Commensalisme ^a	Parasitisme
		Mutualisme	Phorésie ^b	Prédation
			Inquilinisme ^b	
	Neutre	Commensalisme		
		Phorésie	Neutralisme	Amensalisme ^c
		Inquilinisme		
	Négatif	Parasitisme		Compétition
		Prédation	Amensalisme	Conflit

En rouge sont notées les relations correspondant à des symbioses répondant à la définition de De BARY.

^a Relation où un seul partenaire tire bénéfice de la relation. L'autre partenaire n'a ni avantage ni coût à s'associer.

^b Ces deux relations sont des types de commensalismes particuliers. Pour la phorésie, l'un des partenaires est transporté par l'autre (*e.g.* le poisson pilote [*Remora sp.*] des raies). Dans le cas de l'inquilinisme, un des partenaires (généralement le plus gros) sert d'abri à l'autre (*e.g.* les poissons ou crustacés s'abritant dans la cavité palléale des mollusques)

^c Cette association correspond à l'inhibition de la croissance d'une espèce par une autre espèce (*e.g.* Le champignon *Penicillium sp.* et sa capacité antibiotique).

Il existe toutefois des exceptions à cette règle (*i.e.* transmission verticale = mutualisme et transmission horizontale = parasitisme). Tel est le cas des bactéries dites manipulatrices de la reproduction. Ces micro-organismes ne sont pas mutualistes mais sont transmis verticalement par voie maternelle (*e.g.* *Cardinium*, *Rickettsia* ou *Wolbachia* associées aux arthropodes terrestres). Dans ces modèles, les symbiotes sont intégrés aux gamètes de l'hôte (cytoplasme de l'œuf) et ont développé des mécanismes garantissant leur transmission. Cette dernière se fait soit au détriment du sexe non transmetteur : (i) Male-killing (Hurst and Jiggins, 2000), (ii) Féminisation (Giorgini *et al.*, 2009; Rigaud *et al.*, 1999) et (iii) Parthénogénèse thélytoque (Groot and Breeuwer, 2006; Stouthamer *et al.*, 1993), soit au détriment de la descendance des femelles non infectées : Incompatibilité Cytoplasmique (Gotoh *et al.*, 2007; Hoffmann *et al.*, 1986).

Les parasites transmis par voie materno-fœtale (assimilée à la transmission verticale) constituent une autre exception à la règle. C'est le cas par exemple du protozoaire *Neospora caninum* (Cole *et al.*, 1995). La littérature décrit également des associations où à l'évidence la transmission du symbiote n'est pas verticale, mais où la nature de l'association symbiotique est considérée comme mutualiste. C'est le cas de l'association *Rhizobium*/Légumineuses (Beringer *et al.*, 1979), des coraux associés aux dinoflagellés (Dubinsky *et al.*, 1990) ou de certaines associations (celles sans transmission verticale du symbiote) entre invertébrés marins et bactéries chimioautotrophes. C'est d'ailleurs à ces derniers cas que le terme de transmission environnementale a été appliqué en lieu et place de celui de transmission horizontale.

Cependant, ces associations constituent-elles réellement une exception (*i.e.* mutualisme à transmission environnementale ou horizontale) à la règle ? On peut répondre oui, si elles sont effectivement mutualistes et qu'il y a réellement transmission du symbiote. Mais la réponse sera non si en réalité elles correspondent à un autre paradigme, celui d'associations non mutualistes et/ou sans transmission du symbiote. C'est à cette question que je me suis intéressé à travers l'étude des associations entre « invertébrés » marins et bactéries chimioautotrophes *via* le modèle Lucinidae/bactéries sulfo-oxydantes. D'autre part j'ai axé mes travaux de recherche sur la diversité des bactéries sulfo-oxydantes associées aux Lucinidae et sur l'étude de la spécificité d'association entre ces deux partenaires.

LES ASSOCIATIONS CHIMIOAUTOTROPHES

Le travail présenté dans ce mémoire s'inscrit dans le champ d'étude des associations symbiotiques entre « invertébrés » marins et bactéries chimioautotrophes (*i.e.* bactéries capables de fixer le carbone à partir de composés chimiques inorganiques). Ce type d'association a été découvert au niveau des sources hydrothermales profondes (Felbeck *et al.*, 1981) puis a été mis en évidence au niveau des sources de fluides froids situées sur les marges continentales (Juniper and Sibuet, 1987). Ces deux environnements profonds se caractérisent par la présence de fortes concentrations en composés réduits tels que le méthane ou les sulfures. Ces associations ont également été retrouvées au sein de divers autres habitats caractérisés par la présence de composés réduits servant de source d'énergie primaire. Ainsi les carcasses de baleines (Deming *et al.*, 1997) ou les bois coulés (Duperron *et al.*, 2008b; Gros and Gaill, 2007; Gros *et al.*, 2007) sont colonisés pas des organismes chimiosymbiotiques exploitant les produits issus de la décomposition du substrat (*e.g.* bois, lipides, etc...) par des micro-organismes. Enfin on retrouve aussi de telles associations dans des environnements plus accessibles où les concentrations en composés réduits sont relativement faibles tels que les herbiers à phanérogames en eau peu profondes (Berg and Alatalo, 1984) ou les boues de mangroves (Schweimanns and Felbeck, 1985).

DIVERSITE DES ASSOCIATIONS CHIMIOAUTOTROPHES

Diversité des hôtes

Ces associations présentent une grande diversité d'hôtes. Elles ont été décrites dans de nombreux taxons allant des mollusques aux nématodes en passant par les arthropodes, les bryozoaires ou les annélides (pour revue, voir Dubilier *et al.*, 2008). Ces associations peuvent être en ecto-symbiose (ou épibiose) comme décrit chez de la crevette *Rimicaris exoculata* (Polz and Cavanaugh, 1995; Zbinden *et al.*, 2008) ou en endo-symbiose. Ce dernier type de symbiose peut être extracellulaire, comme chez les bryozoaires du genre *Watersipora* (Anderson and Haygood, 2007; Zimmer and Woollacott, 1983), les nématodes du genre *Astronema* où les symbiotes sont situés dans la lumière du tube digestif (Musat *et al.*, 2007; Ott *et al.*, 2004), ou les annélides des genres *Inanidrilus* (Blazejak *et al.*, 2006) et *Olavius*

(Woyke *et al.*, 2006) dans lesquels les symbiotes sont localisés sous la cuticule. L'endosymbiose peut également être intracellulaire comme chez la plupart des Mollusques bivalves où les symbiotes sont localisés dans des cellules spécialisées des branchies : les bactériocytes (pour revue voir Dubilier *et al.*, 2008; Fisher, 1990).

Diversité des symbiotes

Les symbiotes associés dans ce type de relations présentent également une certaine diversité taxonomique. Cette dernière a essentiellement été mise en évidence grâce au séquençage du gène de l'ARNr 16S. Sur la base des séquences de ce marqueur, les symbiotes sulfo-oxydants par exemple formeraient au moins 9 grandes lignées distinctes (pour revue voir Dubilier *et al.*, 2008). La majorité des symbiotes appartient à la classe des gamma-protéobactéries. Néanmoins, on retrouve également des alpha-protéobactéries chez les bryozoaires du genre *Watersipora* (Anderson and Haygood, 2007), des delta-protéobactéries chez les vers oligochètes du genre *Olavius* (Woyke *et al.*, 2006), des epsilon-protéobactéries chez la crevette *Rimicaris exoculata* (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003), et des Cytophaga-Flaviobacterium-Bacterioides chez une moule du genre *Idas* (Duperron *et al.*, 2008a).

Diversité métabolique

Outre cette diversité taxonomique on trouve également chez ces symbiotes de multiples métabolismes. Si la majorité des symbiotes possède un métabolisme de type sulfo-oxydant, il existe également des méthanotrophes (Cavanaugh *et al.*, 1992; Childress *et al.*, 1986; Duperron *et al.*, 2005), des sulfato-réducteurs (Woyke *et al.*, 2006), et des ferroxidants (Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003; Zbinden *et al.*, 2004). Pour certaines associations les métabolismes bactériens ont été inférés grâce au positionnement phylogénétique des symbiotes (basé sur l'ARNr 16S). Par ailleurs, des analyses d'isotopes, génomiques et/ou protéomiques des enzymes intervenant dans les différentes voies métaboliques impliquées ont souvent confirmé les résultats obtenus à l'aide de l'ARNr 16S (pour revue, voir Dubilier *et al.*, 2008).

INTRODUCTION

Diversité d'« infection »

Au sein de ces associations il existe aussi une diversité de « patrons d'infection ». Si dans la majorité des cas, un seul type symbiotique (aussi bien au niveau taxonomique que métabolique) est retrouvé, des cas de multi-infections ont été décrits. Ainsi, deux morphotypes bactériens différents au sein des branchies de la moule *Bathymodiolus thermophilus* ont été observés (Fisher *et al.*, 1993). Ces derniers ont été caractérisés par la détection d'activités enzymatiques confirmant ainsi la présence d'un symbiote thioautotrophe (activité ATP sulfurylase) et d'un méthanotrophe (activité méthanol deshydrogénase) (Fisher *et al.*, 1993). Ceci a constitué la première observation de bi-infection au sein d'un même individu. Plus tard, la coexistence de six symbiotes différents a été mise en évidence au sein d'une moule du genre *Idas* (Duperron *et al.*, 2008a). Ces patrons de multi-infection semblent être courant chez les moules mais sont également retrouvés au sein d'autres types d'hôtes. Ainsi Woyke *et al.* (2006) ont observé chez le ver *Olavius algarvensis* quatre symbiotes différents. Deux d'entre eux sont des delta-protéobactéries sulfato-réductrices et les deux autres des gamma-protéobactéries. Pour ces dernières le métabolisme sulfo-oxydant n'a pu être validé que dans un seul cas. Cette association présente d'autant plus d'intérêt qu'il s'agit de la première observation de colonisation au sein du même individu de symbiotes oxydant et réduisant le soufre. De fait, cette symbiose présente la particularité de pouvoir fonctionner en circuit fermé sans apport extérieur.

NATURE DES ASSOCIATIONS CHIMIOAUTOTROPHES

Au sein des associations entre « invertébrés » marins et bactéries chimioautotrophes, la nature de l'association a été définie indépendamment du mode de transmission du symbiote. Ces dernières sont décrites comme bénéfiques pour les deux partenaires (Stewart *et al.*, 2005). Du côté de l'hôte, considérant le rôle nutritionnel et adaptatif de la bactérie, héberger un symbiote apparaît essentiel (Berg and Alatalo, 1984; Fisher, 1990). En effet, la fixation du carbone couvre une grande partie des besoins nutritionnels de l'hôte (Stewart *et al.*, 2005). De plus, la symbiose confère à ces derniers la capacité de fixer du carbone indépendamment de la photosynthèse, capacité normalement absente chez les eucaryotes non photosynthétiques. Enfin, la bactérie permettrait à l'hôte de coloniser des milieux plus instables (*e.g.* sources hydrothermales, suintement froids etc...) où sont présents des

dégagements de composés réduits tels que les sulfides (H_2S), le soufre étant toxique pour la cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire (Arndt *et al.*, 2001). Du côté du symbiote, l'intracellularité conférerait à la bactérie un environnement plus stable que les sédiments et permettrait un meilleur accès aux substrats nécessaires à son métabolisme (*e.g.* CO_2 , sulfides). En effet, la filtration de l'eau environnante par les branchies concentrerait ces composés aux abords des symbiotes.

Si pour les modèles où la transmission du symbiote est verticale (*e.g.* Vesicomidae, Solemyidae) (Cary, 1994; Cary and Giovannoni, 1993; Krueger *et al.*, 1996), l'hypothèse mutualiste ne fait aucun doute, qu'en est-il pour les Lucinidae et les modèles sans transmission verticale du symbiote? Ces derniers constituent-ils une exception à la règle (*i.e.* mutualisme sans transmission verticale) ou l'hypothèse du mutualisme est-elle erronée? Dans cette partie du travail je me suis intéressé au mode de transmission du symbiote chez les Lucinidae et aux conséquences de ce dernier sur la nature de l'association afin de confirmer ou de rejeter l'hypothèse mutualiste.

LES LUCINIDAE

Les Lucinidae sont une famille de bivalves appartenant à la super-famille des Lucinoidea et à l'ordre des Veneroidea (Fig. 1). Ils constituent la famille la plus disparate et la plus riche en termes d'espèces au sein des mollusques chimiosymbiotiques (Fig. 2 Taylor and Glover, 2005).

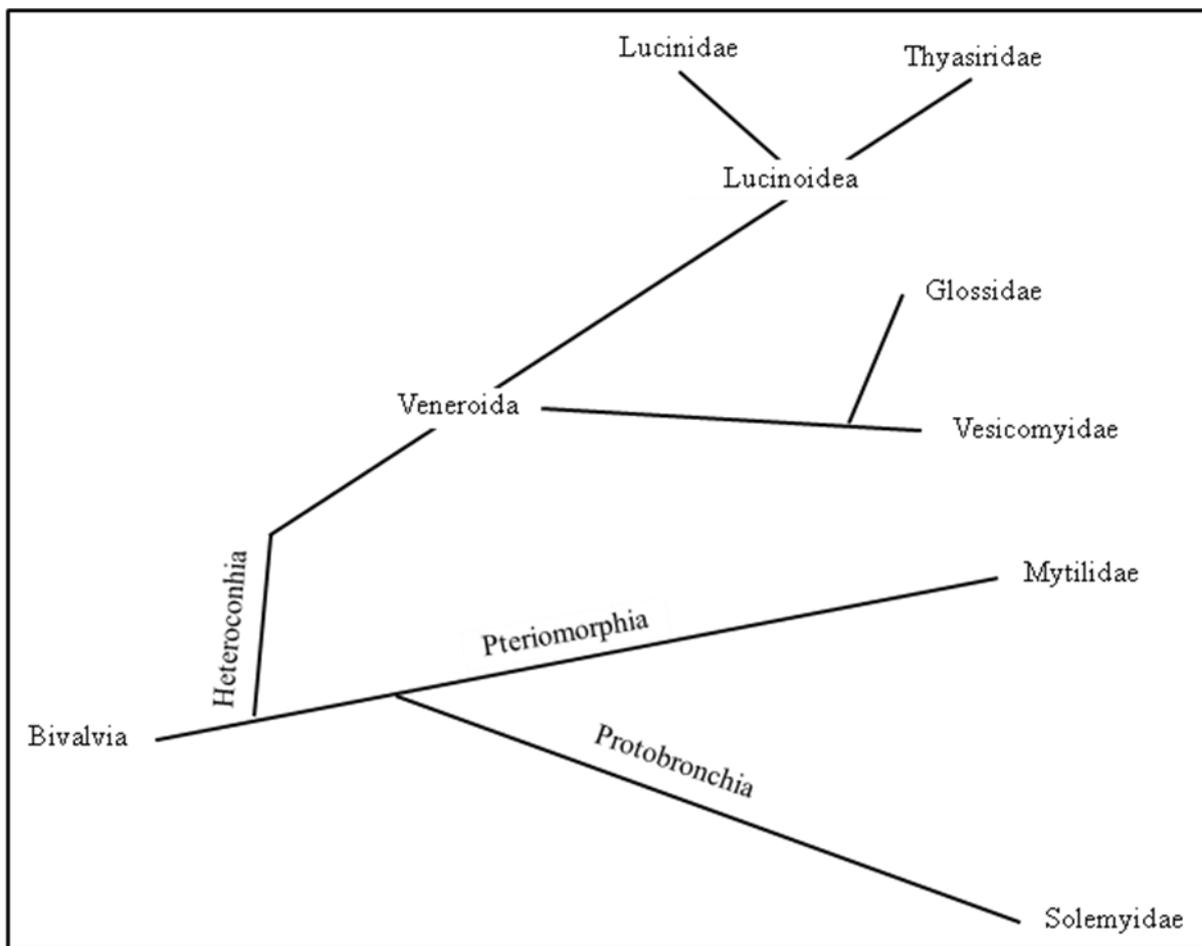


Figure 1. Représentation schématique de la taxonomie des bivalves chimiosymbiotiques.

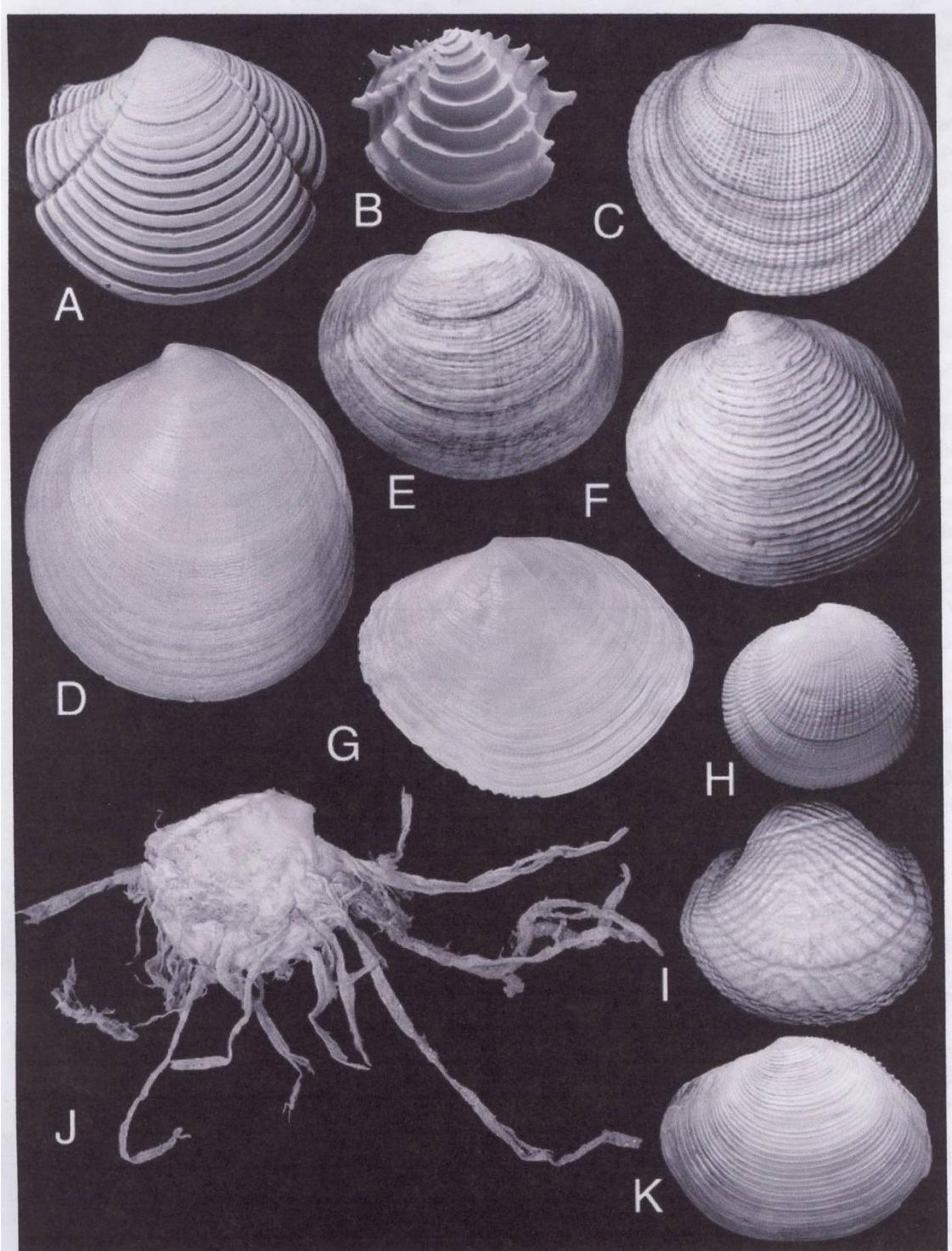
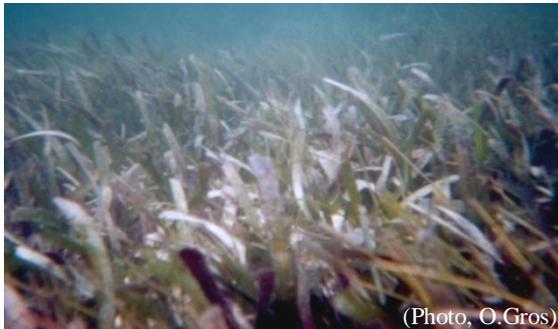


Figure 2 Diversité de formes chez les Lucinidae.

A, *Plicolucina flabellata* ; B, *Lamellolucina trisulcata* ; C, *Codakia tigerina* ; D, *Anodontia philippiana* ; E, *Miltha childrenae* ; F, *Eomiltha voorhoevi* ; G, *Austriella corrugata* ; H, *Ctena bella* ; I, *Rasta lamyi* ; J, *Pompholigina gibba* ; K, *Myrtea spinifera*.

Les Lucinidae s'étendent sur une large aire géographique (60°N-55°S) et sont retrouvés aussi bien dans les zones tropicales que tempérées. Même si la majorité d'entre eux colonisent des



(Photo, O.Gros)

Figure 5. Herbier à *Thalassia testudinum*.

milieux relativement peu profonds certains spécimens ont été décrits aux alentours des sources de fluides froids (Duperron *et al.*, 2007). Ces bivalves colonisent donc une grande variété d'habitats allant de la zone littorale (0-200m) à la zone bathyale (200-2000m). Ils sont ainsi

retrouvés au sein des herbiers à phanérogames

(Fig. 3) (genres *Zostera* ou *Thalassia*), des boues de mangroves de palétuviers (Fig. 4), des sédiments réduits et d'une façon plus générale au sein des environnements présentant des dégagements de soufre réduit plus ou moins



(Photo, O.Gros)

Figure 4. Mangrove de palétuviers, *Rhizophora mangle*.

importants, conséquences de la dégradation de matière organique. Ils sont enfouis dans les

sédiments aux alentours de poches de soufre, dans des sortes de terriers communicants avec

l'extérieur (*i.e.* colonne permettant la circulation de inhalant permet l'entrée organique. Il est creusé et lucines n'ayant pas de ne possèdent en effet qu'un dans le conduit exhalant et déchets. D'autre part, des supposés avoir été creusés poches de soufre ont *et al.*, 1989).

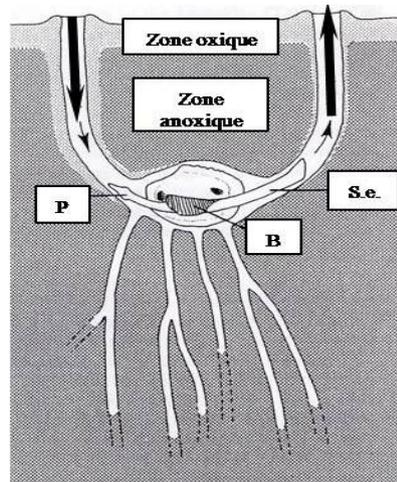


Figure 3. Habitat typique des Lucinidae.
P : Pied, B : Branchie, S.e. : Siphon exhalant. (Tiré de Fisher, 1990 ; dessiné par R.E. Kochevar)

d'eau) *via* deux conduits l'eau (Fig. 5). Le conduit d'oxygène et de matière maintenu par le pied, les siphon inhalant. Ces dernières siphon exhalant qui est placé permet ainsi l'évacuation des conduits plus petits qui sont par l'animal à la recherche des également été observés (Cary

MORPHOLOGIE

Il a été suggéré que la symbiose constituerait le facteur le plus important dans l'évolution de la famille des Lucinidae (Reid and Brand, 1986). Ces derniers se caractérisent par de larges branchies hypertrophiées, l'absence de siphon inhalant, et un intestin et des palpes labiaux réduits, toutes ces caractéristiques étant présumées dues à l'adaptation de ces bivalves au mode de vie symbiotique.

Les branchies (Fig. 6) sont composées de deux demi-branchies accolées constituées de filaments branchiaux (Annexe 1). Ces filaments sont composés chez les adultes de trois régions distinctes (Annexe 1): une zone ciliée courte, une zone intermédiaire et une zone latérale (Gros *et al.*, 1999; Gros *et al.*, 1997). Cette dernière représente la majeure partie du filament branchial et est composée de quatre types cellulaires: les mucocytes, les cellules à grains, les cellules intercalaires et les bactériocytes. Ces bactériocytes constituent le type cellulaire majoritaire et abritent les symbiotes. On trouve ces derniers dans des vacuoles, avec généralement une seule bactérie par vacuole. Cependant plusieurs bactéries dans une même vacuole ont également été observées (Distel and Felbeck, 1988).

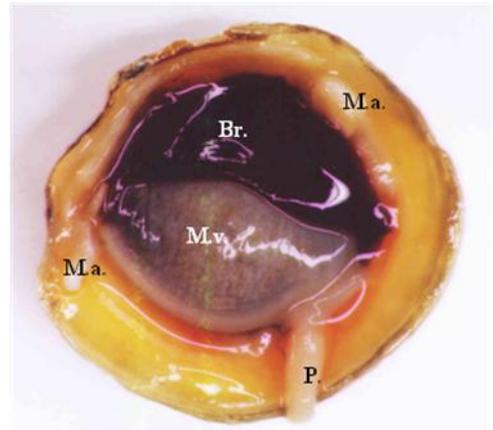


Figure 6. Anatomie générale des Lucinidae. Br. Branchies, M.a. Muscles adducteurs, P. pied, M.v. Masse viscérale. (*Lucina pectinata*, Photo, O. Gros)

SYMBIOSE.

Tous les Lucinidae analysés à ce jour hébergent au sein de leurs branchies des bactéries symbiotiques. Ces dernières appartiennent à la classe des gamma-protéobactéries (sur la base du séquençage de l'ARNr 16S) et sont sulfo-oxydantes. Le mode de transmission du symbiote est supposé environnemental car : (i) l'acquisition du symbiote se fait au stade juvénile après métamorphose (Gros *et al.*, 1998b). (ii) Aucun symbiote n'a pu être détecté que ce soit par PCR ou par microscopie électronique dans les gamètes, œufs, embryons, ou larves de différentes lucines (Gros *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 1998a). (iii) La forme libre du symbiote a

INTRODUCTION

été mise en évidence dans les sédiments des herbiers à *Thalassia testudinum* (Gros *et al.*, 2003b).

Cette association est considérée comme mutualiste comme toutes les symbioses entre « invertébrés » marins et bactéries chimiotrophes. En effet, la bactérie est présumée responsable de la détoxification du milieu (soufre). Cependant, certains auteurs ont également incombé ce rôle à l'hémoglobine conjuguée à la présence de « sulfur-oxidizing bodies » (Arndt *et al.*, 2001; Liberge *et al.*, 2001). En effet, cette dernière a été décrite dans les branchies de diverses lucines (Ball *et al.*, 2009; Dando *et al.*, 1985; Frenkiel *et al.*, 1996; Gavira *et al.*, 2008; Kraus and Wittenberg, 1990). Cependant l'hémoglobine a également la capacité de fixer l'O₂ en plus du H₂S (Kraus, 1993). De fait, selon Dando *et al.* (1985) cette dernière pourrait également agir en tant que stockeur d'oxygène durant les phases d'enfouissement du bivalve ou protéger les symbiotes de concentrations trop élevées en O₂, les bactéries sulfo-oxydantes étant souvent micro-aérophiles (Jorgensen, 1982). Il est donc difficile de savoir qui des symbiotes ou des hôtes détoxifie le milieu. Outre le rôle présumé de détoxification, les symbiotes supportent une grande partie des besoins nutritionnels de l'hôte. En effet, le Lucinidae bénéficierait du métabolisme en profitant de la fixation du carbone *via* le cycle de Calvin-Benson. Du côté du symbiote, les branchies permettraient un meilleur accès aux substrats métaboliques (CO₂, H₂S).

Même si cette symbiose n'est pas physiologiquement obligatoire (il est possible d'obtenir des juvéniles asymbiotiques et de débarrasser les adultes de leurs symbiotes) cette association apporte au bivalve un avantage sélectif certain. En effet, Gros *et al.* (1998b) ont montré que les spécimens symbiotiques avaient une croissance plus importante que les non symbiotiques. D'autre part, la prévalence de 100% dans la nature de cette association est une observation qui va également dans ce sens.

EVOLUTION

Dans cette famille de bivalves, la capacité à établir une association symbiotique semble être un héritage ancestral. La symbiose aurait été acquise vers -250 Millions d'années avant la divergence des différentes familles (Thyasiridae, Lucinidae, Ungulinidae et Fimbriidae) appartenant à la superfamille des Lucinacea (Boss, 1970; Newell, 1969). Bien qu'elle ait été perdue totalement chez les Ungulinidae et partiellement chez les Thyasiridae

(Reid and Brand, 1986), cette association a été maintenue chez les Lucinidae attestant une fois de plus de son importance. Cependant, les questions de l'origine et de l'histoire évolutive des couples symbiotiques actuels ainsi que les facteurs ayant permis le maintien d'une telle association sans transmission verticale restent posées.

1.

***NATURE DE
L'ASSOCIATION***

NATURE DE L'ASSOCIATION

*« Le rêve de toute
cellule : devenir deux
cellules »*

(F. Jacob)

NATURE DE L'ASSOCIATION

NATURE DE L'ASSOCIATION

INTRODUCTION

L'association Lucinidae/bactéries sulfo-oxydantes est classiquement considérée comme étant de type mutualiste. Concernant le mode de transmission du symbiote, Gros *et al.* (1996; 1998a; 2003b) ayant réussi l'infection au laboratoire de juvéniles asymbiotiques à partir de sable et ayant détecté la forme libre du symbiote dans les herbiers, ces auteurs ont proposé l'hypothèse de transmission environnementale du symbiote.

Pour que l'association symbiotique se perpétue de générations en générations, sous les hypothèses du mutualisme et de la transmission environnementale il faut que le processus de transmission s'opère selon le modèle présenté Figure 7. Quant à la validité de ce modèle elle dépend de trois paramètres : (i) la présence d'une forme libre du symbiote dans l'environnement, (ii) la multiplication du symbiote à l'intérieur des branchies de l'hôte et (iii) le re-largage dans l'environnement du symbiote par les adultes.

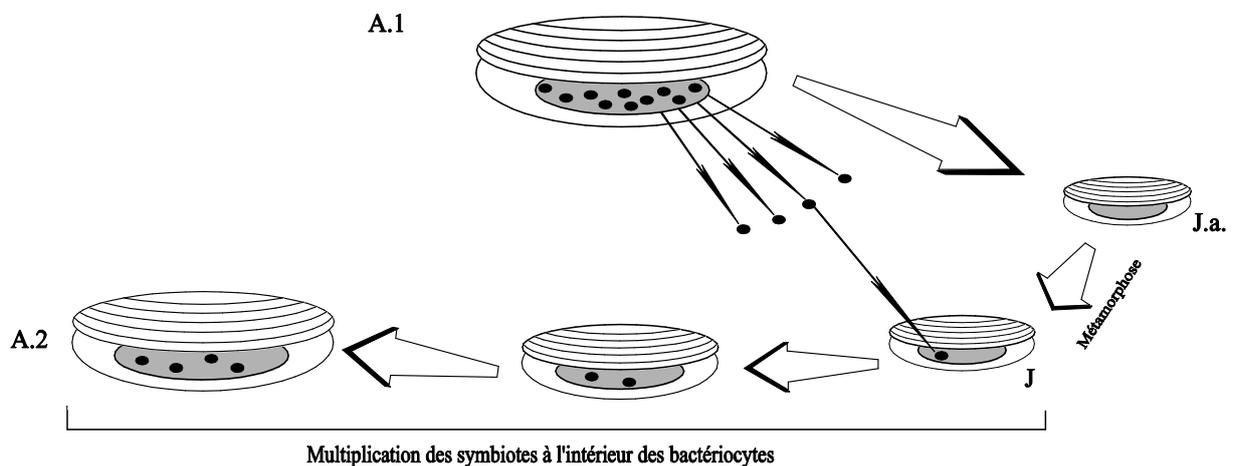


Figure 7. Représentation schématique de la transmission environnementale.

Les symbiotes sont acquis par les juvéniles à partir de symbiotes re-largués par les adultes de la génération contemporaine après multiplication de ces derniers dans les branchies. A.1 : Adultes de la génération parentale, A.2 : Adultes de la génération suivante, J.a. : Juvéniles asymbiotiques, J. : Juvéniles, ellipses : bactéries endosymbiotiques.

La forme libre du symbiote a effectivement été mise en évidence dans les sédiments par CARD-FISH sur filtre grâce à la sonde symco2A (Gros *et al.*, 2003b) qui est spécifique de l'ARNr 16S de l'espèce symbiotique associée à *Codakia orbicularis* (Gros *et al.*, 1996). Ces résultats corroborent donc l'hypothèse de transmission environnementale précédemment émise. Concernant la multiplication des symbiotes, Caro *et al.* (2007) ont analysé la population bactérienne au sein des branchies de *C. orbicularis* par cytométrie en flux. Ces auteurs ont mis en évidence différentes sous populations bactériennes qui se différencient en fonction de leur contenu génomique, allant de une à 20 copies du génome bactérien. D'autre part, les sous populations contenant une copie du génome (sous population de bactéries en phase stationnaire) ou deux copies (sous populations de bactéries en potentielle division) étaient largement minoritaire (Fig. 8). Il y aurait donc, au sein des branchies de *C. orbicularis*, une majorité de symbiotes possédant plusieurs copies de leur génome. De ces observations, les auteurs ont conclu que la réplication du matériel génétique avait bien lieu chez les symbiotes de Lucinidae mais que cette polyploïdisation traduirait une absence de division cellulaire. Ceci pourrait être dû à l'inhibition de la cytodierèse bactérienne par l'hôte. Il n'y aurait donc pas à proprement parler de multiplication du symbiote à l'intérieur des branchies de Lucinidae. Pour ma part j'en conclus que cette absence de multiplication du symbiote à l'intérieur des bactériocytes ne peut supporter l'hypothèse de la transmission environnementale.

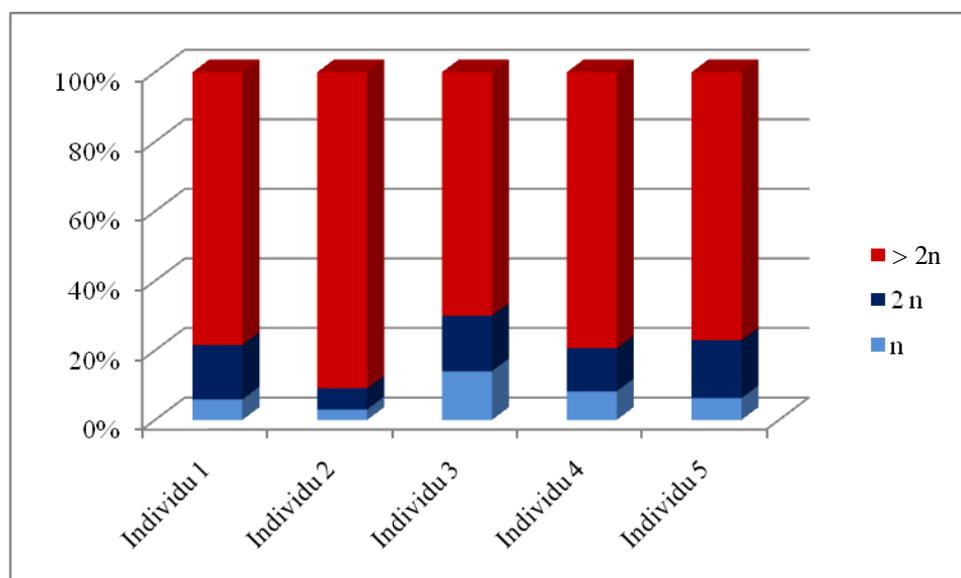


Figure 8. Analyse des différentes sous-populations bactériennes retrouvées dans les branchies de divers individus de l'espèce *Codakia orbicularis*.

En bleu clair sont retrouvées deux sous-populations (P1 et P2) correspondant à des bactéries avec une seule copie du génome, en bleu foncé les symbiotes possédant deux copies (P3 à P5) et en rouge les sous-populations avec plus de deux copies (P6 et P7). Tiré de Caro *et al.* (2007).

Je me suis donc intéressé au troisième paramètre : le relarguage du symbiote dans l'environnement par les adultes. Pour cela j'ai recherché, au laboratoire, à mettre en évidence ce phénomène chez des individus de *C. orbicularis* et *C. orbiculata* en utilisant une méthode de détection du symbiote par hybridation *in situ*.

DEMARCHE EXPERIMENTALE

SPECIMENS ET CONDITIONS D'ENTRETIEN

Dix individus de *C. orbicularis* (environ 40mm de long) et 22 individus de *C. orbiculata* (environ 15mm) provenant de l'Îlet Cochon (Guadeloupe) ont été répartis au laboratoire dans 500 ml d'eau de mer filtrée à 0,2 μm (eau de mer dépourvue de bactéries) dans 10 cristallisoirs comme suit :

- Deux cristallisoirs contenant chacun un spécimen¹ de *C. orbicularis*.
- Quatre cristallisoirs contenant chacun deux spécimens² de *C. orbicularis*.
- Quatre cristallisoirs contenant chacun 5 ou 6 spécimens de *C. orbiculata*.

Afin de limiter l'éventuelle ré-acquisition de symbiotes, due à la filtration de l'eau par le bivalve, les lucines ont été placées à mi-hauteur dans des cristallisoirs. Il n'y a eu ni ajout de soufre, ni ajout de nourriture au cours de l'expérience. L'expérimentation a été conduite durant un mois avec changement de l'eau tous les jours. Un contrôle positif (eau de mer filtrée à 0,2 μm contenant un extrait de branchie de *C. orbicularis*) a également été réalisé afin de s'assurer que les symbiotes pouvaient être détectés par notre technique.

DETECTION DU RELARGUAGE DES SYMBIOTES

Le seuil de détection de notre méthode a d'abord été évalué. Pour ce faire, un extrait de branchie a été purifié sur percoll selon Caro *et al.* (2007) et quantifié sur cellule de Malassez. Cet inoculum a ensuite été utilisé afin de constituer différents échantillons

¹ Cette condition a été réalisée afin de limiter l'éventuelle acquisition de symbiotes relargués par un individu hôte voisin.

² Cette condition a été réalisée pour augmenter le relarguage s'il existe et ainsi maximiser les chances de le détecter

NATURE DE L'ASSOCIATION

contenant 0, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ bactéries/ml. Pour le relarguage, des échantillons d'eau provenant des différents cristallisoirs ont été collectés à T₀, toutes les quatre heures le premier jour, tous les jours les cinq suivants puis pour finir tous les cinq jours. Ceci a produit un total de 140 échantillons. Les deux types d'échantillon (seuil de détection et recherche de symbiotes relargués) ont été fixés 4h en PFA 4% à 4°C et filtrés sur filtres GTTP (Millipore, France). Des sections de filtre (environ ¼ de filtre) ont directement été analysés ou stockés à -80°C avant analyse.

SUIVI DE LA POPULATION BACTERIENNE A L'INTERIEUR DES BRANCHIES PAR CARD-FISH ET MET

Afin de suivre l'évolution de la population symbiotique au sein des branchies, des individus ont été sacrifiés à T₀, T₀+10 jours, T₀+20 jours et T₀+30 jours. Des sections de branchies de ces individus ont été réalisées et analysées en CARD-FISH. Pour la microscopie électronique des individus ont été sacrifiés à T₀ et T₀+30 jours. Après dissection, les échantillons de branchies ont été fixés deux heures en glutaraldéhyde 2,5%/Tampon cacodylate (0,1M) à pH 7,2 (conservé iso-osmotique à l'eau de mer par addition de CaCl₂) puis lavées 3 fois dans le même tampon iso-osmotique. Les morceaux de branchies ont ensuite été fixés plusieurs heures à température ambiante dans du tetroxide d'osmium 1% (même tampon) et rincées en eau distillée avant post-fixation (1h en uranyle acétate aqueux 2%), déshydratation (bains croissants successifs d'éthanol et d'oxyde de propylène) puis incluses dans un mélange Epon-Araldite. Des sections de 60nm d'épaisseur ont été réalisées, colorées à l'uranyle d'acétate et au lead citrate avant observation par un microscope électronique à transmission Leo912.

CARD-FISH

Les morceaux de branchies ou de filtres ont été hybridés avec les sondes EUB338, qui s'hybride avec l'ARNr 16S de la majorité des eubactéries (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999) et la sonde Symco2A. L'inclusion a été réalisée selon Dubilier *et al.* (1995). Pour les branchies, après inclusion, des sections de 4µm ont été réalisées et collées sur lames SuperFrost® (Menzel-Glazer®). Les sections ont ensuite été déparaffinées dans du Toluène 100% et réhydratées (éthanol 100%, 95%, 70% suivi d'eau distillée). Les lames ont ensuite été lavées en HCl 0,2M (12 min à RT), Tris/HCl 20mM (10 min), protéinase K (0,5 µg.mL⁻¹, 5 min à 37°C) puis dans du Tris/HCl 20mM (10 min).

Le CARD-FISH a ensuite été réalisé selon Pernthaler *et al.* (2002) aussi bien pour les sections histologiques que pour les filtres jusqu'à l'étape du tampon de lavage. Les échantillons sont ensuite rincés deux fois en PBS 1X (15 min à RT) puis incubés dans un tampon d'amplification (1/10 [w/v] de dextrane sulfate, PBS 1X, NaCl 2M et 1/100 [v/v] de blocking reagent 10%), de l'eau oxygénée à 0,5% (diluée dans du PBS 1X) et 2 μ L de tyramide marquée en fluorescence pendant 15 min à 37°C dans le noir. Les sections ou filtres sont ensuite lavés en PBS 1X, eau distillée et deux fois en éthanol absolu. Les échantillons sont séchés, contre-colorés au DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) inclus en milieu DAKO et observés sous microscope à fluorescence epi80i (NIKON, France).

RESULTATS

RECHERCHE DE SYMBIOTES RELARGUES

Afin de s'assurer de la sensibilité de la technique utilisée, nous avons défini le nombre minimal de bactéries nécessaires pour observer un signal dans de l'eau de mer filtrée à 0,2 μ m contenant une fraction purifiée de symbiotes de *C. orbicularis*. Ceci a été réalisé sur des échantillons contenant de 0 à 10⁷ bactéries/ml. Les deux sondes utilisées, EUB338 (généraliste des eubactéries [Fig. 9c]) et Symco2A (spécifique des symbiotes de Lucinidae [Fig. 9e et 9f]) se sont révélées suffisamment efficaces pour détecter au moins 10 bactéries/ml (densité minimale testée), le contrôle négatif (eau de mer filtrée à 0,2 μ m) demeurant négatif pour les deux sondes. Concernant la détection du symbiote, sur les 140 observations réalisées (un mois d'expérimentation) aucun signal positif n'est apparu (Fig. 9g) avec la sonde Symco2A que ce soit pour les échantillons précoces (toutes les 4h sans changement d'eau ; de T₀ à T₀+20h) ou tardifs (de T₀+1 à T₀+30). Dans tous les cas le contrôle positif interne d'hybridation (EUB338) a donné un signal positif (Fig. 9d). La contre-coloration au DAPI a confirmé que les signaux d'hybridations positifs correspondaient à des bactéries et non à des particules auto-fluorescentes du sédiment (Fig. 9a et 9b)

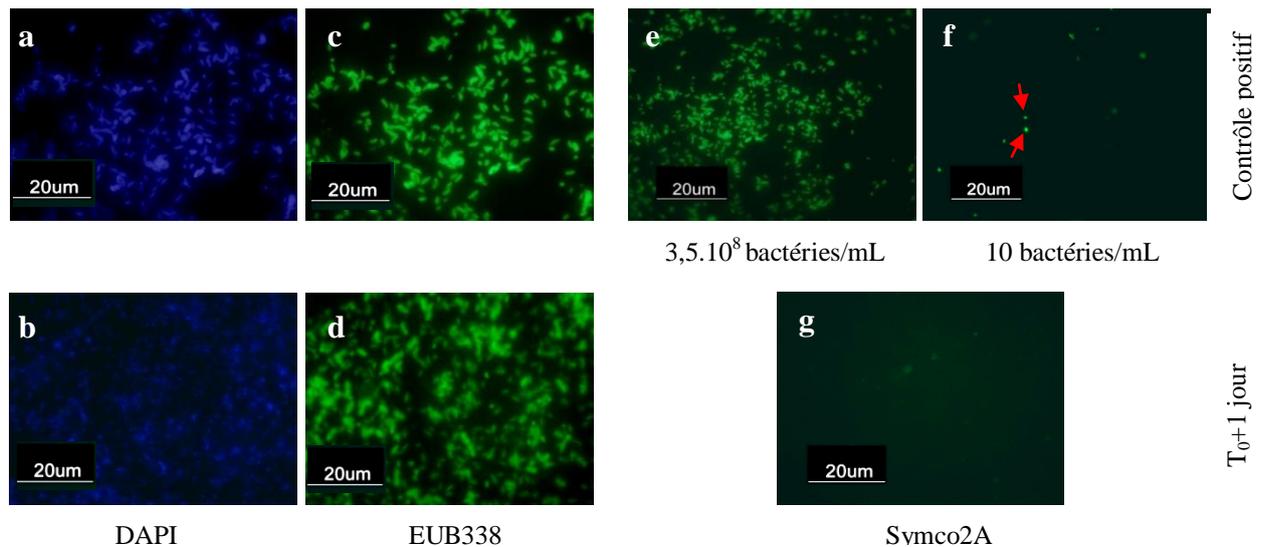


Figure 9. Recherche de symbiotes re-largués.

La rangée supérieure correspond au contrôle positif de détection ainsi qu'à l'évaluation du seuil de détection du CARD-FISH. La rangée inférieure correspond à l'analyse de l'eau après 1 jour. (a et b) : contrôle DAPI de la coloration des acides nucléiques. (c et d) hybridation avec EUB338 spécifique de la majorité des eubactéries. (e, f et g) hybridation avec Symco2A sonde spécifique des symbiotes de *C. orbicularis* et *C. orbiculata* sur : une fraction purifiée de symbiotes de *C. orbicularis* non diluée (e) ou diluée à une densité de 10 bactéries/mL (f). symbiotes : flèches rouges

EVOLUTION DE LA POPULATION BACTERIENNE AU SEIN DES BRANCHIES

A 0, 10, 20 et 30 jours d'expérimentation, des individus ont été sacrifiés afin de pouvoir suivre la population bactérienne intracellulaire. Ces échantillons ont été analysés en CARD-FISH (hybridation avec Symco2A et EUB338) et par microscopie électronique.

CARD-FISH : Dans tous les cas, les sondes s'hybrident au niveau de la zone latérale où sont distribués les symbiotes. Aucune différence notable n'est apparue entre les sections de branchies à T_0 (Fig. 10A), T_0+10 jours et T_0+20 jours. A l'inverse, sur les sections provenant d'individus sacrifiés à la fin de l'expérience (T_0+30 jours) un signal d'hybridation plus faible est observé (Fig. 10B).

TEM : Après 1 mois de jeûne on peut observer des modifications notables du filament branchial (Fig. 10C) par rapport à l'observation d'un adulte n'ayant pas subi de jeûne. Ainsi, on observe une diminution du nombre de bactéries et l'apparition de nombreux lysosomes secondaires (Fig. 10D), indiquant probablement une digestion intracellulaire des symbiotes.

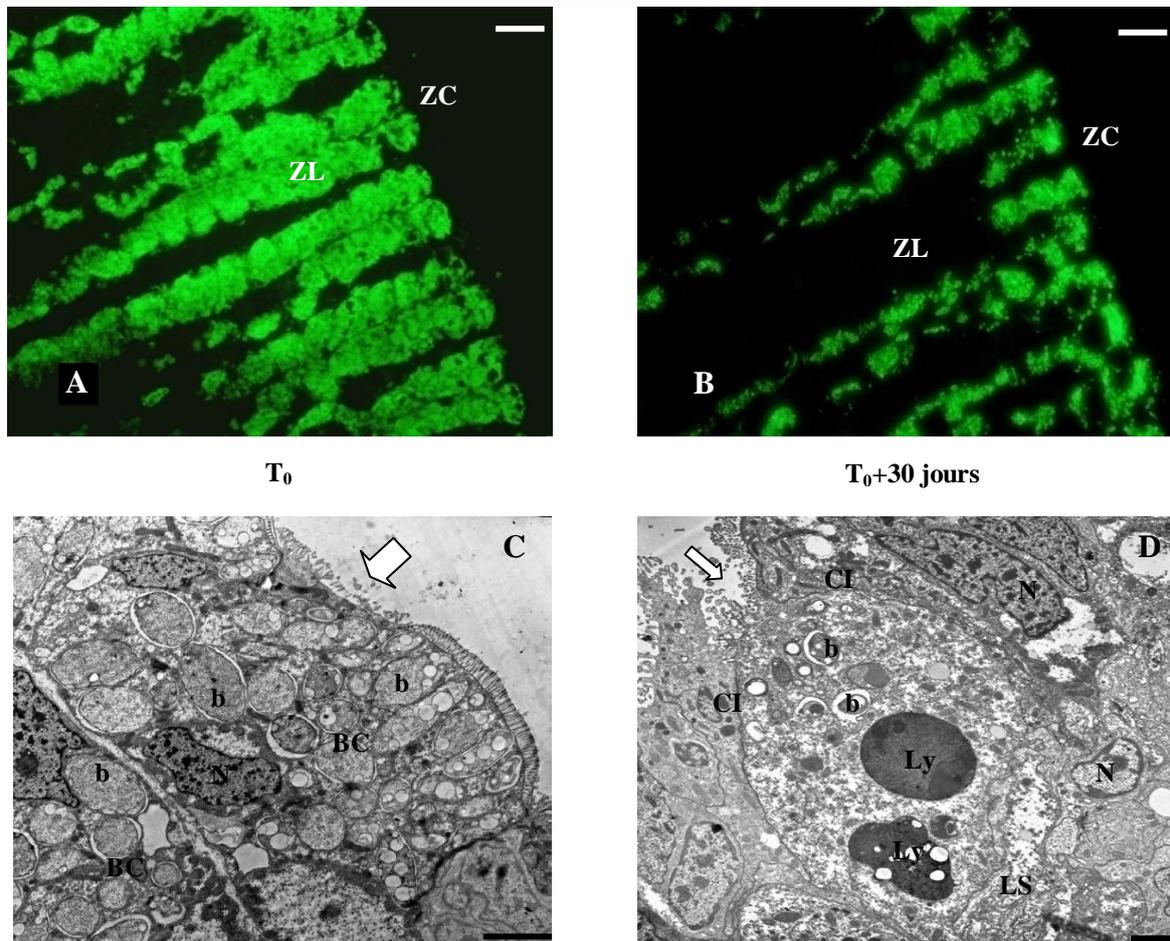


Figure 10. Suivi de la population symbiotique à l'intérieur des branchies.

A et B : CARD-FISH réalisé à l'aide de la sonde Symco2A. A : Section de branchie de *C. orbicularis*. B : Section de branchie de *C. orbicularis* après 30 jours de jeûne. ZC, Zone Ciliée ; ZL, Zone Latérale ; échelles =20 μ m.

C et D : Modifications ultra-structurales dans les branchies de *C. orbicularis*. C : Les bactériocytes (BC), type cellulaire majoritaire, possèdent un noyau basal (N) et un pôle apical en contact avec l'eau de mer de la cavité palléale (flèches blanche). Des bactéries (b) internalisées dans des vacuoles parsèment le cytoplasme. D : Après 30 jours de jeûne des bactériocytes (BC) résiduels sont observés avec peu de bactéries (b) et de larges lysosomes secondaires (Ly). Les plus gros symbiotes ont disparu et ne demeurent que les plus petits à la périphérie de la cellule. LS, Lacune Sanguine ; N, Noyau ; échelles = 0,5 μ m. (MET, Images O. Gros)

DISCUSSION

Le but de ce chapitre était de déterminer la nature exacte de la relation Lucinidae/bactéries chimioautotrophes *via* l'étude du mode de transmission du symbiote. Des études antérieures ayant montré qu'il n'y avait pas de symbiotes présents dans les gamètes, œufs, embryons ou larves de diverses lucines ont permis de rejeter l'hypothèse de la transmission verticale (Gros *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 1998a). De plus, ces auteurs ont également réalisé au laboratoire l'infection de juvéniles asymbiotiques de Lucinidae à partir

de sable provenant des herbiers à *Thalassia testudinum* (Gros *et al.*, 1998b) où la forme libre du symbiote a été détectée (Gros *et al.*, 2003b). De fait, ces observations ont conduit ces auteurs à proposer l'hypothèse de la transmission environnementale *i.e.* infection de la nouvelle génération à partir d'un stock de symbiotes présents dans l'environnement (Gros *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 1998a; Gros *et al.*, 1999; Gros *et al.*, 2003b). La transmission environnementale étant un passage d'hôte (*i.e.* adultes) à hôte (*i.e.* juvéniles) *via* l'environnement, cette dernière nécessite la présence de la forme libre dans les sédiments (qui a été détectée), la multiplication du symbiote dans les bactériocytes (qui ne semble pas avoir lieu) et le relarguage de ce dernier par les adultes. C'est à ce troisième paramètre non encore étudié que je me suis intéressé. Grâce à des techniques d'hybridation *in situ*, j'ai recherché au laboratoire à mettre en évidence d'éventuels symbiotes relargués.

Après 1 mois d'expérimentation, aucun signe de symbiotes relargués n'a pu être observé. Quelles hypothèses seraient à même d'expliquer ce résultat ? (i) Les conditions expérimentales n'étaient pas optimales pour permettre le relarguage des symbiotes. En effet, l'expérimentation hors du milieu naturel aurait mis les différents individus en conditions de stress induisant un comportement anormal de ceux-ci. Cependant, durant toute l'expérience il n'y a eu aucune mortalité ni signe évident de stress due aux conditions d'entretien. (ii) La période à laquelle a été réalisée l'expérimentation (durant le mois d'avril) ne serait pas celle du relarguage dans la nature. En effet, la fin du développement larvaire et la métamorphose ont lieu durant une période bien définie chez les Lucinidae (Juillet-Septembre). Ainsi sous l'hypothèse de transmission environnementale, si le relarguage a lieu ce dernier pourrait être restreint à cette période afin de maximiser l'infection de la nouvelle génération. L'absence de relarguage observée pourrait simplement être due à l'absence de ce phénomène en avril. Cette hypothèse semble peu probable car il est possible d'infecter des juvéniles durant toute l'année et quelque soit l'âge du juvénile (O. Gros, communication personnelle). De fait, le relarguage des symbiotes s'il a lieu ne serait pas restreint à une période particulière. (iii) Le CARD-FISH n'est pas une technique suffisamment efficace pour détecter le relarguage. Néanmoins le suivi de la population symbiotique (voir ci-après) ne semble pas favoriser cette hypothèse. (iv) Le relarguage existe mais ne se produit qu'à la mort de l'individu. Cependant, seuls les micro-organismes parasites possèdent des stratégies de transmission basées sur la mort de leur hôte (Ewald, 1987). Or les symbiotes de Lucinidae comme les symbiotes des associations chimioautotrophes ne sont pas considérés comme délétères (Stewart *et al.*, 2005). Enfin (v), ce phénomène n'a pas lieu chez les Lucinidae et par conséquent, l'hypothèse de transmission

environnementale du symbiote ne peut être retenue. C'est cette dernière hypothèse que je privilégie.

SUIVI DE LA POPULATION SYMBIOTIQUE

Le suivi de la population symbiotique à l'intérieur des branchies a révélé une diminution du signal d'hybridation après 30 jours de jeûne. Ceci pourrait s'expliquer par un relarguage non détecté par le CARD-FISH sur filtre. Cependant cette diminution de signal est apparue trop importante pour correspondre à un relarguage que nous n'aurions pas été capables de visualiser. En effet, en considérant que les branchies de bivalves hébergent environ 3.10^9 bactéries et que la population bactérienne symbiotique diminue de 30% par mois en conditions de jeûne (Caro *et al.*, 2009), il y aurait donc eu relarguage d'environ 3.10^7 bactéries par bivalve par jour. Considérant notre limite de détection de 10 bactéries par ml (*i.e.* signal observé à partir de 5000 bactéries par cristalliseur) ce relarguage n'aurait pu passer inaperçu. De fait, la diminution de la population symbiotique ne saurait être due au relarguage. Cette observation confirme donc l'inexistence de ce dernier.

Il semble que des hypothèses alternatives peuvent néanmoins expliquer la diminution du nombre de bactéries au sein des branchies de Lucinidae. En effet, une diminution de l'activité métabolique due aux conditions expérimentales ou la dégradation lysosomale des symbiotes pourraient être responsables de l'évolution de la population symbiotique. La seconde hypothèse semble à privilégier. En effet, les observations en microscopie électronique montrent une diminution du nombre de symbiotes à l'intérieur des bactériocytes et l'apparition de larges lysosomes secondaires (Fig. 10D) similaires à ceux décrits dans la littérature (Frenkiel *et al.*, 1996; Frenkiel and Mouëza, 1995; Liberge *et al.*, 2001).

LES LUCINIDAE, EXCEPTION A LA REGLE ?

Même si la transmission environnementale n'est pas complètement rejetée par nos expériences de relarguage en laboratoire, peu de preuves supportent cette dernière. En effet, l'absence de transmission verticale, l'infection à partir de sable, la présence de la forme libre du symbiote dans les sédiments, l'absence de multiplication du symbiote dans les branchies et l'absence de re-larguage ne concourent pas globalement à valider l'hypothèse d'un passage du symbiote d'hôte à hôte et par conséquent l'usage même du terme « transmission ». En conséquence, l'absence de multiplication du symbiote à l'intérieur des branchies des

Lucinidae (Caro *et al.*, 2007) et de relarguage après internalisation (comme l'indique mes résultats) me conduisent à considérer que les juvéniles de Lucinidae acquièrent leur symbiotes uniquement à partir d'un stock de symbiotes qui ne se multiplie que dans l'environnement. Ceci m'a donc permis de rejeter l'hypothèse de transmission environnementale du symbiote au profit d'un strict recrutement environnemental chez les Lucinidae (Fig.11).

Dès lors, quelles peuvent être les conséquences de cette nouvelle hypothèse sur la nature de la relation entre les Lucinidae et leurs symbiotes sulfo-oxydants ? Peut-on toujours considérer cette association comme étant de type mutualiste ? Pour moi, non. En effet, sous cette hypothèse de recrutement environnemental l'hôte bénéficie toujours de l'association tel que décrit dans l'introduction (pages 26-27). Par contre, une fois internalisée, la bactérie ne pouvant ni se multiplier ni être relarguée, l'entrée en symbiose constituerait pour cette dernière une impasse évolutive, le succès reproducteur d'une bactérie endocytée étant alors nul.

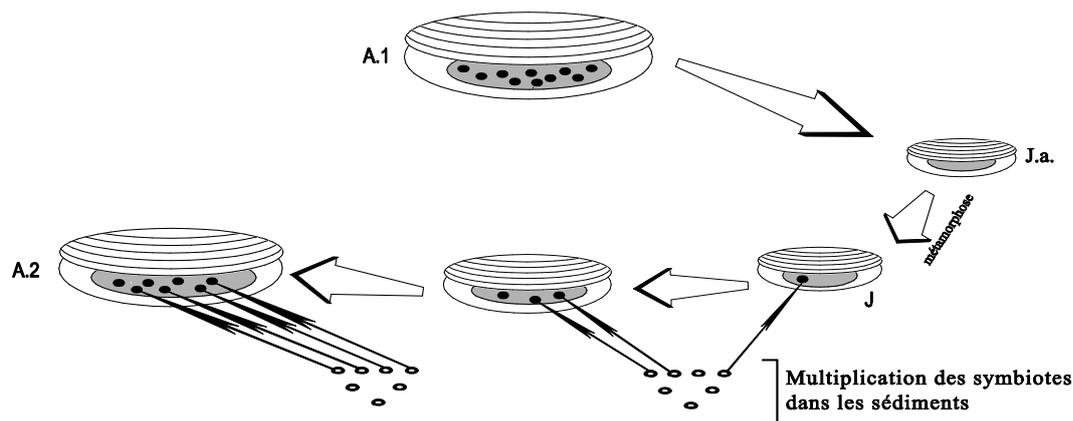


Figure 11. Représentation schématique du recrutement environnemental.

Les symbiotes sont acquis par les juvéniles à partir d'un stock de symbiotes qui se multiplie dans l'environnement A.1 : Adultes de la génération parentale, A.2 : Adultes de la génération suivante, J.a. : Juvéniles asymbiotiques, J. : Juvéniles, ellipses pleines : bactéries endosymbiotiques, ellipses vides : formes libre du symbiote.

CONCLUSION

Dans la relation entre nature de la symbiose et mode de transmission du symbiote, il existe face à la règle générale, des exceptions (*i.e.* symbiotes non mutualistes à transmission verticale d'une part et symbiotes « mutualistes » non transmis verticalement d'autre part).

C'est à cette seconde exception que semblait correspondre le cas des associations entre Lucinidae et bactéries sulfo-oxydantes. Mes conclusions me conduisent à considérer qu'il ne s'agit en fait pas d'une exception à la règle puisqu'il ne s'agirait pas d'une symbiose de type mutualiste. Ceci constituerait une association symbiotique tout a fait originale puisque que la persistance de l'association symbiotique d'une génération à l'autre se ferait sans transmission du symbiote.

2.

***DIVERSITE
BACTERIENNE
ET
SPECIFICITE
D'ASSOCIATION***

*« Les parasites sélectionnent les
meilleurs hôtes et les hôtes les meilleurs
parasites. »*

(C. Combes)

DIVERSITE BACTERIENNE

DIVERSITE INTERSPECIFIQUE

Depuis la découverte des associations chimio-synthétiques, la connaissance de la diversité des symbiotes chimioautotrophes a essentiellement été caractérisée via l'étude de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S). Récemment, compte tenu des caractéristiques métaboliques de ces bactéries, d'autres marqueurs ont également été utilisés tels que la Ribulose-1,5-bis-Phosphate Carboxylase/Oxygénase (RubisCO), caractéristique des chimioautotrophes, l'adenosine-5'-Phosphate Réductase (APS Réductase) propre aux sulfo-oxydantes et la méthane mono-oxygénase des méthanotrophes (Duperron *et al.*, 2007; Spiridonova *et al.*, 2006; Vrijenhoek *et al.*, 2007). Cependant, l'ARNr 16S continue à être le marqueur le plus couramment utilisé pour caractériser les symbiotes associés dans ce type de relations. Ce marqueur a également été utilisé dans l'étude de l'histoire évolutive de ces symbioses, la question de l'origine des couples actuels étant posée. En effet, les deux partenaires peuvent avoir co-évolué ou non à partir d'un couple symbiotique ancestral. La comparaison des phylogénies moléculaires des hôtes et des symbiotes est l'un des moyens permettant de trancher entre ces alternatives (Peek *et al.*, 1998a). En effet, en cas de co-évolution, les deux phylogénies doivent être congruentes attestant d'une histoire évolutive commune des deux partenaires.

Chez les Lucinidae, des données moléculaires propres aux hôtes ou aux symbiotes ont déjà été fournis par de précédents travaux. Cependant, aucune données moléculaires obtenues conjointement chez les hôtes et chez leurs symbiotes n'étaient à ce jour disponibles. Ainsi, côté hôte, les relations entre espèces hôte appartenant aux Lucinacea (Thyasiridae, Lucinidae et Fimbriidae etc...) ont été étudiées grâce aux ARNs ribosomaux 18S et 28S (Williams *et al.*, 2003). Côté symbiote, plusieurs études utilisant l'ARNr 16S ont permis la caractérisation de la diversité symbiotique associée aux Lucinidae mais ont abouti à des

résultats contradictoires. Les premiers travaux ont été conduits par Distel *et al.* (1994; 1988). Leurs analyses ont porté sur les symbiotes associés à 6 espèces hôtes réparties dans 4 genres différents, ces espèces provenant d'habitats variés aussi bien en termes de localisation géographique qu'en termes de biotope (Tableau B). Pour ces auteurs, les résultats obtenus montrent que chaque espèce hôte héberge un type symbiotique qui lui est propre. Ceci leur a suggéré une spécificité d'association entre symbiotes et hôtes les conduisant à poser l'hypothèse « d'associations stables, espèces-spécifiques avec un seul type bactérien dominant par espèce hôte. [...] La congruence entre la phylogénie des symbiotes et la classification des hôtes attestant d'une histoire évolutive commune » (Distel *et al.*, 1994).

Ultérieurement, une autre série d'analyses a été réalisée au sein des Antilles Françaises (Guadeloupe, la Désirade et Martinique) portant également sur 6 couples symbiotiques répartis dans 4 genres d'hôtes (Tableau C). Dans ces dernières études, l'échantillonnage a été réalisé dans un seul écosystème, les herbiers à phanérogames de *Thalassia testudinum* (Durand and Gros, 1996; Durand *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2003a). Ces auteurs ont mis en évidence une seule espèce bactérienne partagée par ces 6 espèces hôte de Lucinidae. Cette dernière observation infirme donc l'hypothèse proposée précédemment (*i.e.* association espèce-spécifique due à la co-évolution des deux partenaires à partir d'un couple ancestral). En effet, selon ces auteurs, leur résultats ne « supportent pas l'hypothèse d'associations monospécifiques entre « invertébrés » marins et bactéries chimioautotrophes » (Gros *et al.*, 2003a).

Ces premières études utilisant l'ARNr 16S ont abouti à des résultats contradictoires conduisant les différents auteurs à émettre des hypothèses opposées. De plus, dans ces études, la phylogénie moléculaire des bactéries n'a été comparée qu'à la seule classification morphologique des hôtes. Or selon Taylor & Glover (2005), en dépit de l'intérêt porté à ce groupe de bivalves, cette classification demeure confuse à tous les niveaux taxonomiques. Ce n'est que plus tard, grâce à l'utilisation des outils moléculaires, qu'une grande partie de ces incertitudes a pu être levée (Taylor *et al.*, 2007). En conclusion, entre études moléculaires sur les symbiotes aux conclusions contradictoires d'un côté et études moléculaires réalisées sur les hôtes de l'autre, une comparaison entre phylogénie moléculaire des symbiotes et phylogénie moléculaire des hôtes restait à faire. Cette dernière permettrait de mieux comprendre l'origine et l'histoire évolutive des couples actuels.

Tableau B. Echantillonnage de Distel *et al.* (1994; 1988).

Espèces hôte	Lieux de collecte	Habitats	Profondeurs^a (m)
<i>Anodontia philipiana</i>	Ferry Reach (Bermudes)	Mangrove	Zone intertidale
<i>Codakia costata</i>	Whalebone Bay (Bermudes)	Herbier	Zone intertidale
<i>Codakia orbicularis</i>	Nassau(Bahamas)	Herbier	Zone intertidale
<i>Lucina floridana</i>	St Joseph Bay (Floride)	Herbier	Zone intertidale
<i>Lucinoma aequizonata</i>	Santa Barbara Basin (Californie)	Sédiments	500
<i>Lucinoma annulata</i>	Santa Monica Bay (Californie)	Sédiments	100

^a La zone intertidale correspond à la zone de balancement des marées.

Tableau C. Echantillonnage de Durand *et al.* (1996) ; Durand & Gros (1996) ; Gros *et al.* (2000; 2003a).

Espèces hôte	Lieux de collecte	Habitats	Profondeurs^a (m)
<i>Anodontia alba</i>	Îlet Cochon (Guadeloupe)	Herbier	Zone intertidale
<i>Codakia orbicularis</i>	Îlet Cochon (Guadeloupe)	Herbier	Zone intertidale
<i>Codakia orbiculata</i>	Îlet Cochon (Guadeloupe)	Herbier	Zone intertidale
<i>Codakia pectinella</i>	Îlet Cochon (Guadeloupe)	Herbier	Zone intertidale
<i>Divaricella quadrisulcata</i>	Plage des galets (La Désirade)	Herbier	Zone intertidale
<i>Linga pensylvanica</i>	Anse Macabou (Martinique)	Herbier	Zone intertidale

^a La zone intertidale correspond à la zone de balancement des marées.

Je me suis donc intéressé à l'évolution des couples hôtes/symbiotes et à la diversité bactérienne associée aux Lucinidae, en comparant les phylogénies moléculaires des deux partenaires afin de déterminer si ces derniers avaient co-évolué ou non à partir d'un couple symbiotique ancestral. J'ai réalisé ceci d'une part en reprenant les données de la littérature et d'autre part en y ajoutant des résultats obtenus à partir de spécimens provenant de la Caraïbe et des Philippines (Campagne PANGLAO 2005). J'ai ainsi établi la phylogénie moléculaire des hôtes à l'aide des séquences des gènes des ARNr 18S et 28S et celle des symbiotes en utilisant l'ARNr 16S d'une part et un gène caractéristique des bactéries sulfo-oxydantes, l'APS Réductase d'autre part.

DEMARCHE EXPERIMENTALE.

ECHANTILLONNAGE.

Les différents échantillons philippins ont été collectés lors de la campagne PANGLAO en mai 2005 (chef scientifique: P. Bouchet) dans la mer de Bohol (8,3-9,6°N et 123-124°E) par chalutage à des profondeurs comprises entre 219 et 1775m. Les détails concernant les différents spécimens sont présentés Tableau D. Les échantillons ont été traités comme suit une heure après la collecte : une branchie de chaque spécimen a été stockée dans de l'éthanol absolu pour l'analyse moléculaire et la seconde préparée pour l'étude en microscopie électronique. Les spécimens de la Caraïbe ont été les suivants : *Anodontia alba*, *Codakia orbicularis* et *Lucina pectinata*. Ces espèces hôte proviennent pour *A. alba* d'une mangrove d'Haïti et d'un herbier de Guadeloupe, pour *L. pectinata* de mangroves d'Haïti et de Guadeloupe et pour *C. orbicularis*, uniquement d'un herbier de Guadeloupe (Îlet Cochon).

EXTRACTIONS D'ADN ET AMPLIFICATIONS PAR PCR.

L'ADN matrice nécessaire à l'amplification par PCR a été extrait des branchies de chaque individu selon la méthode CetylTrimethyl Ammonium Bromide (CTAB, Ishaq *et al.*, 1990). La concentration d'ADN de chaque échantillon a été contrôlée par spectrophotométrie (BioPhotometer, eppendorf) et sur gel d'agarose 1% en comparaison avec un marqueur de concentration (Smart Ladder, Eurogentec). Les gènes bactériens (ARNr 16S et APS Réductase) et ceux des hôtes (ARNr 18S et 28S) ont été amplifiés à partir de l'ADN matrice en utilisant les amorces présentées tableau E. Les amplifications ont été réalisées dans 50µL avec 5µL de Taq buffer 10X (Invitrogen), 3mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,4mM de chaque dNTP, 1mM de chaque amorce, 1 unité de Taq DNA Polymérase Recombinante (Invitrogen) et 25 à 50ng d'ADN. Les cibles sont amplifiées en 30 cycles (1 min à 94°C, 1 min au T_m optimal [voir tableau E] et 1min 30 à 72°C) avec une dénaturation initiale de 10 min à 94°C et une élongation finale de 15 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite contrôlés sur gel d'agarose à 1% et directement séquencés (GATC-biotech, <http://www.gatc-biotech.fr>).



Figure 12. Carte présentant les lieux d'échantillonnage des différentes espèces de Lucinidae analysées.

- Distel *et al.* (1988 ;1994)
- Durand & Gros (1996) ; Durand *et al.* (1996)
- Cette étude

DIVERSITE BACTERIENNE

Tableau D. Echantillonnage réalisé pour cette étude de la diversité des symbiotes de Lucinidae

Code	Espèce hôte ^a	Lieu de collecte	Habitat ^b	Profondeur (m) ^c	Localisation GPS
OG18	<i>Lucinoma sp.</i>	Bohol Sea Off Balicasag Island	nd	271-318	9°29.4'N 123°43.7'E
OG57	nd	Bohol Sea	nd	1764-1775	9°24.3'N 124°10.7'E
OG98	<i>Gloverina sp.</i>	Bohol/Sulu Seas Sill	nd	357-372	8°49.9'N 123°37.6'E
OG101	<i>Cardiolucina quadrata</i>	Bohol Sea	nd	762-786	9°26.9'N 123°34.5'E
OG103	<i>Myrtea flabelliformis</i>	Bohol Sea	nd	762-786	9°26.9'N 123°34.5'E
OG108	nd	Bohol Sea	nd	627 -645	9°27.4'N 123°43.1'E
ALBA	<i>Anodontia alba</i>	Îlet Cochon (Guadeloupe)	Herbier	Zone intertidale	16°12'53.76"N 61°32'05.74"O
AH	<i>Anodontia alba</i>	Haïti	Mangrove	Zone intertidale	nd
CIS	<i>Codakia orbicularis</i>	Îlet Cochon (Guadeloupe)	Herbier	Zone intertidale	16°12'53.76"N 61°32'05.74"O
LPEC	<i>Lucina pectinata</i>	La manche à eau (Guadeloupe)	Mangrove	Zone intertidale	16°16'37"N 61°3'25.91"O
LH	<i>Lucina pectinata</i>	Haïti	Mangrove	Zone intertidale	nd

^a Concernant les échantillons des Philippines, la détermination des espèces a été réalisée par John D. Taylor (NHM, UK) sur la base des caractères morphologiques de la coquille.

^b La récolte ayant été réalisée par chalutage, les biotopes précis sont inconnus pour les spécimens des Philippines, ceci dit, compte tenu de la profondeur il est vraisemblable qu'il s'agisse de sédiments réduits.

^c La zone intertidale correspond à la zone de balancement des marées.

^d nd : non déterminé

Les séquences obtenues ont été contrôlées par BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) et alignées avec ClustalW paramétré par défaut (Thompson *et al.*, 1994). L'alignement a ensuite été vérifié et corrigé manuellement si nécessaire. Les « gaps » et les positions ambiguës ont été retirés de l'alignement en utilisant Gblocks 0.91b (Castresana, 2000). L'alignement a ensuite été importé dans le logiciel TOPALi v2.5 (Milne *et al.*, 2004) pour définir, en utilisant ModelGenerator (Keane *et al.*, 2006), le modèle de substitution à utiliser pour chaque jeu de données. Le meilleur modèle est celui possédant un score de « Bayesian Information Criterion » le plus bas (Schwarz, 1978). Les arbres ont ensuite été reconstruits par Maximum de Vraisemblance (MV) en utilisant PhyML 2.5 (Guindon and Gascuel, 2003) et par Inférence Bayésienne (IB) en utilisant MrBayes3 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Les supports pour les différents nœuds ont été évalués utilisant les bootstrap non paramétriques (Felsenstein, 1985) obtenus pour 100 répétitions (MV). Les probabilités postérieures de chaque nœud (IB) ont également été évaluées (runs=5, generations=1 000 000, sampling=1 000, burn=10%).

Tableau E. Amorces et conditions de PCR utilisées dans cette étude.

Noms	Séquences (5' → 3')	Tm ^a	Cibles	Ref ^b
16S_UNIV-8f	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	54°C	ARNr 16S	[1]
16S_UNIV-1492r	TACGGCTACCTTGTTACGACT			
APS-FW	TGGCAGATMATGATYMACGGG	58°C	APS Reductase	[2]
APS-RV	GGGCCGTAACCGTCCTTGAA			
LSU-900f	CCGTCTTGAAACACGGACCAAG	52°C	ARNr 28S	[3]
LSU-1600r	AGGCCATCCATTTTCAGG			
18S-5'f	CTGGTTGATYCTGCCAGT	54°C	ARNr 18S	[5]
18S-1100r	CTTCGAACCTCTGACTTTGG			

^aTempérature optimale pour l'amplification par PCR.

^bRéférences bibliographiques : [1] (Lane, 1991), [2] (Deplancke *et al.*, 2000), [3] (Olson *et al.*, 2003), [4] (Williams *et al.*, 2003), [5] (Winnepenninckx *et al.*, 1998).

ÉVOLUTION DES COUPLES SYMBIOTIQUES

Que ce soit pour les gènes bactériens (ARNr 16S et APS Réductase) ou ceux des hôtes (ARNr 18S et 28S), l'analyse des chromatogrammes a révélé une séquence unique par échantillon analysé. Les phylogénies basées sur les séquences des ARNr 18S et 28S étant congruentes, la phylogénie des hôtes a été réalisée après concaténation des séquences de ces gènes (1252 sites) avec comme groupes extérieurs les Crassatellidae et les Thyasiridae, groupes frères des Lucinidae (Fig. 12). Cette phylogénie permet de replacer nos échantillons dans l'arbre des Lucinidae au sein des clades décrits par Williams *et al.* (2003). Clade Anodontia pour OG57 et OG98, clade Myrtea pour OG108 et clade B pour OG101. L'ARNr 18S d'OG18 n'a pu être obtenu compte tenu de l'état de conservation de l'ADN. Néanmoins la phylogénie basée sur l'ARNr 28S permet de placer ce spécimen dans le clade B. Enfin concernant OG103, aucune séquence hôte n'a pu être obtenue, cependant la détermination de l'espèce sur des caractères morphologiques permet de placer ce spécimen dans le clade Myrtea (*Myrtea flabelliformis*, John Taylor communication personnelle). Enfin concernant les spécimens *A. alba*, *C. orbicularis* et *L. pectinata* collectés aux Caraïbes (Haïti et Guadeloupe), les séquences obtenues à partir des hôtes correspondent à celle publiées par Williams *et al.* (2003).

Les Lucinidae philippins, hébergent tous des bactéries symbiotiques. En se basant sur ces séquences d'ARNr 16S ces symbiotes appartiennent au clade monophylétique correspondant aux symbiotes de Lucinoidea (Fig. 13). Par ailleurs, le fait qu'il s'agisse de bactéries sulfo-oxydantes a été attesté par la détection par PCR du gène de l'APS Réductase. L'arbre phylogénétique basé sur les séquences de ce gène (Fig. 14) indique que les symbiotes philippins possèdent comme ceux des Lucinidae analysés à ce jour une APS Réductase appartenant à la lignée II des APS Réductases de bactéries sulfo-oxydantes (Meyer and Kuever, 2007)

La phylogénie des symbiotes (Fig. 13) et la matrice d'identité (Tableau F) permettent de définir trois clades A, B et C qui correspondent à trois espèces bactériennes différentes (pourcentage d'identité inférieur à 97%). L'espèce symbiotique « A » (Fig. 13, clade A) est associée à l'espèce hôte *Lucina pectinata*. L'espèce « B » (Fig. 13, clade B) est associée aux bivalves du genre *Anodontia* à l'exception d'*Anodontia alba*. La troisième espèce « C » correspond aux autres symbiotes de Lucinidae décrits jusqu'alors.

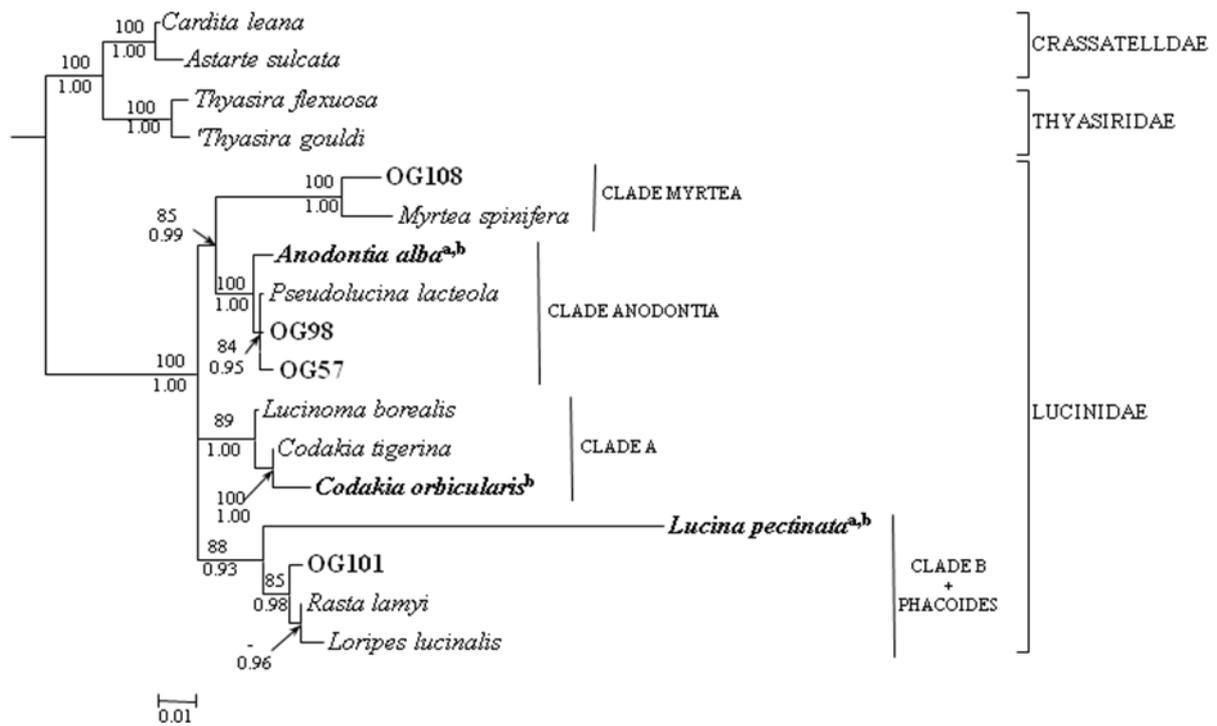


Figure 13. Phylogénie moléculaire des Lucinidae réalisée après concaténation des séquences des ARNs ribosomiaux 18S et 28S (1252 sites).

Cet arbre a été reconstruit par Maximum de Vraisemblance (MV) et Inférence Bayésienne (IB) avec comme modèles d'évolution le TrNef+ Γ (MV) et le SYM+ Γ (IB). Les Crassatellidae et Thyasiridae ont été choisis comme groupes extérieurs. La robustesse des différents nœuds a été évaluée et seules les valeurs de bootstrap (MV, au-dessus des branches) et les probabilités postérieures (IB, au-dessous des branches) supérieures à 80% sont affichées. Les séquences en gras correspondent aux séquences obtenues lors de cette étude et les autres sont tirées de Williams *et al.* (2003).

^a Pour ces espèces hôte, la même séquence est retrouvée quelque soit le lieu de collecte (Haïti ou Guadeloupe).

^b Les 3 séquences obtenues ici correspondent à celles publiées dans Williams *et al.* (2003).

La phylogénie basée sur les séquences de l'ARNr 16S, montre que les symbiotes des spécimens de lucines des Philippines appartiennent à une seule et même espèce (Fig. 13, clade C). En effet, la matrice d'identité réalisée en « pairwise deletion » sur les séquences d'ARNr 16S (Tableau F) indique une identité moyenne entre les séquences supérieure à 97% (97,7%). On observe de plus, trois ribotypes bactériens répartis en deux groupes. Le premier est partagé par OG18, OG98 et OG108 (Fig. 13, groupe I). Ce groupe semble correspondre exactement à un seul et même ribotype (identité moyenne de 99,9%). Le second groupe est représenté par les symbiotes des spécimens OG57, OG101 et OG103 avec apparemment deux ribotypes différents (un propre à OG57 et un partagé par OG101 et OG103 [99,8%]). Il y a donc au sein des six espèces hôtes de Lucinidae des Philippines une seule espèce bactérienne vraisemblablement composée de trois variants. Ces résultats recoupent ceux obtenus par Durand & Gros (1996), Durand *et al.* (1996) et Gros *et al.* (2000; 2003a), dans lesquels

DIVERSITE BACTERIENNE

différentes espèces hôtes hébergent la même espèce bactérienne ou le même ribotype bactérien. Tous ces résultats infirment donc l'hypothèse d'associations espèces-spécifiques dues à la coévolution des deux partenaires à partir d'un couple symbiotique ancestral proposée initialement par Distel *et al.* (1994; 1988). J'en conclus donc que, chez les Lucinidae, l'association serait plutôt labile et pourrait se constituer et se défaire en fonction de l'espèce ou du type bactérien présent dans l'environnement. Qui plus est, cette hypothèse peut également s'appliquer aux observations de Distel *et al.* (1994; 1988). En effet la diversité aussi bien en terme de biotopes que de localisations géographiques de l'échantillonnage pourrait simplement mimer une spécificité d'association liée à l'hôte. Les distances génétiques observées entre symbiotes n'étant pas dues à une quelconque spécificité ou coévolution mais plutôt aux distances géographiques entre les biotopes où avaient été échantillonnées ces espèces hôte. De façon intéressante, les espèces bactériennes « A » et « B » correspondent à des symbiotes hébergés par des hôtes retrouvés dans des environnements où les concentrations en sulfures sont assez élevées (*i.e.* boues de mangroves), comparés aux herbiers à *T. testudinum* (Dando *et al.*, 1985) où l'on retrouve l'espèce « C ». Ces observations suggèrent donc que les espèces bactériennes se répartissent de façon différente d'un biotope à l'autre. Ce point renforce donc l'hypothèse d'association en fonction du type bactérien présent dans l'environnement.

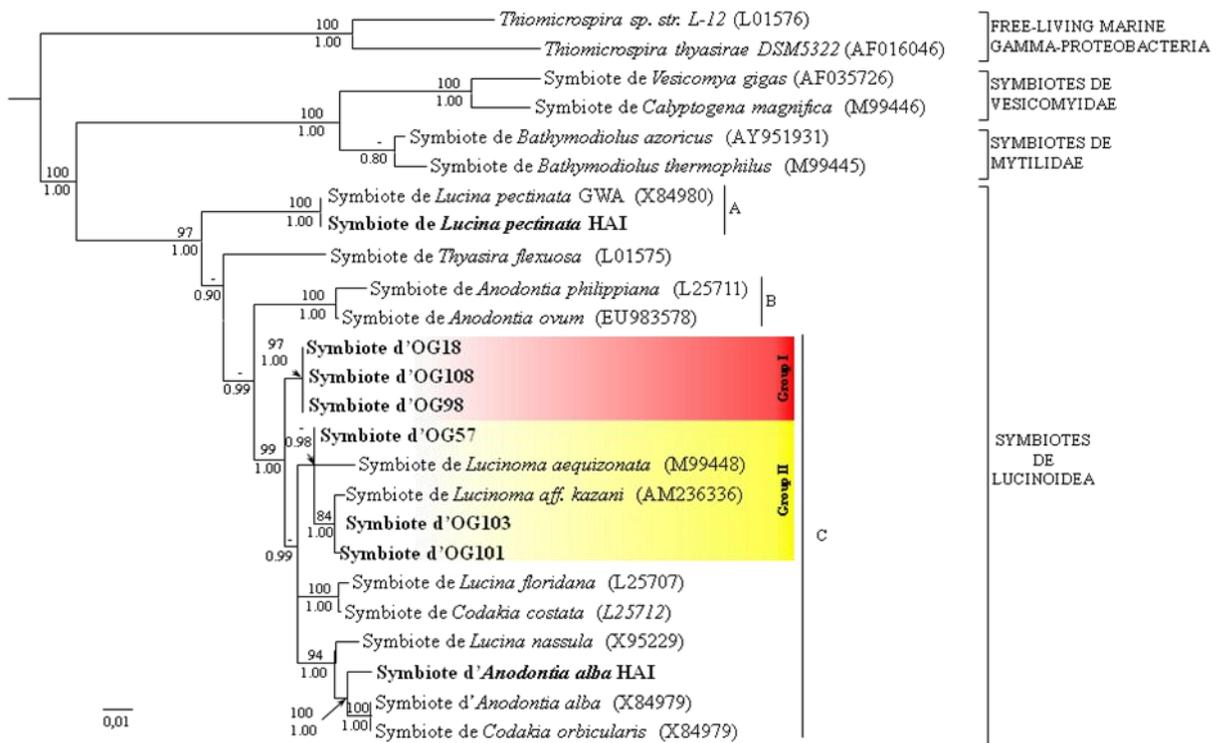


Figure 14. Phylogénie moléculaire des symbiotes chimioautotrophes réalisée grâce aux séquences d'ARNr 16S (1269 sites).

Cet arbre a été reconstruit par Maximum de Vraisemblance (MV) et Inférence Bayésienne (IB) avec comme modèle d'évolution le K80+I+Γ. Des bactéries marines libres ont été choisies comme groupe extérieur. La robustesse des différents nœuds a été évaluée et seules les valeurs de bootstrap (MV, 100 répétitions [au-dessus des branches]) et les probabilités postérieures (IB, runs=5, générations=1 000 000, échantillonnage=1 000, burn=10% [au-dessous des branches]) supérieures à 80% sont affichées. Les séquences en gras correspondent aux séquences obtenues lors de cette étude. HAI : Haïti, GWA : Guadeloupe

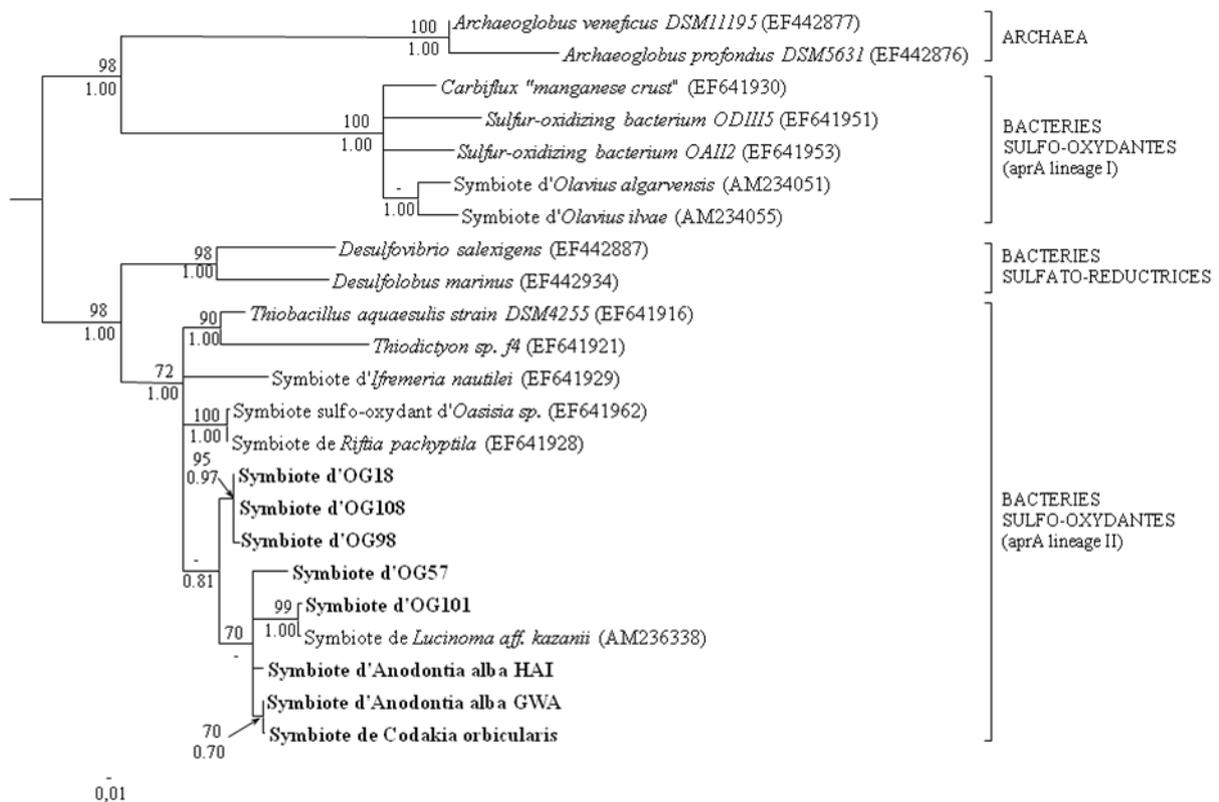


Figure 15. Phylogénie moléculaire des symbiotes chimioautotrophes réalisée grâce aux séquences d'APS Réductase (273 sites).

Cet arbre a été reconstruit par Maximum de Vraisemblance (MV) et Inférence Bayésienne (IB) avec comme modèles d'évolution le TrNef+ Γ (MV) et le K80+ Γ (IB). Des archae on été choisies comme groupe extérieur. La robustesse des différents nœuds a été évaluée et seules les valeurs de bootstrap (MV, 100 répétitions [au-dessus des branches]) et les probabilités postérieures (IB, runs=5, générations=1 000 000, échantillonnage=1 000, burn=10% [au-dessous des branches]) supérieures à 70% sont affichées. Les séquences en gras correspondent aux séquences obtenues lors de cette étude. HAI : Haïti, GWA : Guadeloupe.

Tableau F. Matrice d'identité réalisée en « pairwise deletion » utilisant les séquences d'ARNr 16S.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1: <i>Codakia orbicularis</i>^a	ID																
2: <i>Anodontia alba</i>^a	1,000	ID															
3: <i>Lucina nassula</i>^a	0,984	0,984	ID														
4: <i>Codakia costata</i>^a	0,975	0,975	0,979	ID													
5: <i>Lucina floridana</i>^a	0,971	0,971	0,981	0,996	ID												
6: OG57^a	0,966	0,966	0,971	0,976	0,978	ID											
7: OG101^a	0,970	0,970	0,973	0,982	0,980	0,985	ID										
8: OG103^a	0,970	0,970	0,973	0,978	0,978	0,980	0,993	ID									
9: <i>Lucinoma aff. kazani</i>^a	0,969	0,969	0,973	0,981	0,978	0,982	0,994	0,990	ID								
10: <i>Lucinoma aequizonata</i>^a	0,960	0,960	0,963	0,968	0,966	0,981	0,976	0,973	0,974	ID							
11: OG18^a	0,977	0,977	0,978	0,979	0,976	0,988	0,981	0,984	0,977	0,969	ID						
12: OG98^a	0,971	0,971	0,972	0,973	0,972	0,985	0,978	0,978	0,973	0,968	0,999	ID					
13: OG108^a	0,969	0,969	0,970	0,971	0,972	0,986	0,976	0,976	0,971	0,969	0,999	0,999	ID				
14: <i>Anodontia ovum</i>^a	0,951	0,951	0,959	0,957	0,959	0,952	0,953	0,952	0,951	0,944	0,960	0,955	0,953	ID			
15: <i>Anodontia phillipiana</i>^a	0,947	0,947	0,955	0,949	0,951	0,946	0,947	0,946	0,946	0,938	0,954	0,949	0,946	0,990	ID		
16: <i>Thyasira flexuosa</i>^a	0,942	0,942	0,944	0,945	0,942	0,941	0,941	0,939	0,940	0,933	0,950	0,944	0,942	0,947	0,945	ID	
17: <i>Lucina pectinata</i>^a	0,947	0,947	0,949	0,941	0,939	0,933	0,933	0,932	0,933	0,926	0,941	0,936	0,934	0,945	0,943	0,941	ID

^a Ces séquences correspondent aux symbiotes des hôtes cités.

Reste néanmoins un cas particulier, celui d'*Anodontia alba*. Que cette espèce ait été collectée dans les herbiers de Guadeloupe ou dans les mangroves d'Haïti, elle héberge la même espèce bactérienne. Ces observations suggèrent donc que la forme bactérienne associée à cette espèce hôte peut être retrouvée à la fois en mangroves et en herbiers. Des expériences préliminaires de CARD-FISH sur filtre réalisées sur les sédiments de mangrove de Guadeloupe grâce à une sonde spécifique du symbiote de *Codakia orbicularis* (Symco2A, Gros *et al.*, 2003b), m'ont permis de mettre en évidence que l'espèce bactérienne décrite dans les herbiers pouvait également être présente dans ces sédiments. Il semblerait donc que cette espèce hôte s'associe préférentiellement à la forme bactérienne d'herbiers quand les deux formes de symbiotes cohabitent. Ainsi, en cas de coexistence de plusieurs formes bactériennes une éventuelle spécificité d'association pourrait néanmoins exister.

Cette faible diversité observée chez les symbiotes sulfo-oxydants associés aux Lucinidae pose d'autres questions. Comment expliquer que des hôtes si éloignés sur le plan géographique puissent héberger la même espèce bactérienne (Fig. 13, clade C) ? En effet, dans ce clade C, on retrouve des symbiotes hébergés par des spécimens provenant des Philippines et d'autres comme *Lucina floridana* (Distel *et al.*, 1994), *Lucinoma aff. kazani* (Duperron *et al.*, 2007), *Lucinoma aequizonata* (Distel *et al.*, 1994) ou *Codakia orbicularis* (Distel *et al.*, 1988; Durand *et al.*, 1996) provenant d'autres zones géographiques (respectivement Floride, mer Méditerranée, Californie et Caraïbe). Deux hypothèses peuvent expliquer le faible niveau de diversité de ces symbiotes : (i) une divergence géographique des populations symbiotiques trop récente pour mettre en évidence une divergence génétique, (ii) un taux d'évolution du marqueur utilisé (ARNr 16S) trop faible. La seconde hypothèse apparaît comme plus vraisemblable car il a été démontré par Peek *et al.* (1998b) que les séquences d'ARNr 16S des symbiotes acquis à partir de l'environnement (comme c'est le cas pour les symbiotes de Lucinidae) avaient un taux d'évolution plus lent que les symbiotes à transmission verticale et les bactéries marines libres.

DIVERSITE INTRA-SPECIFIQUE.

Nous avons vu dans la partie précédente que la diversité des symbiotes de Lucinidae était relativement faible. Néanmoins, cette diversité pourrait être sous estimée eu égard au marqueur utilisé. En effet, compte tenu du taux d'évolution relativement lent de l'ARNr 16S, il pourrait exister chez ces symbiotes une diversité que ce marqueur ne permettrait pas de mettre en évidence. De fait, au sein des herbiers à *T. testudinum* des Antilles Françaises, différentes souches appartenant à l'espèce bactérienne hébergée par les six espèces hôte décrites ci-dessus (Tableau B) pourraient être présentes.

Ce type de patron (espèces hôte différentes partageant une même espèce bactérienne) a déjà été décrit dans deux autres familles d' « invertébrés » marins hébergeant également des bactéries thioautotrophes : les Siboglinidae (Feldman *et al.*, 1997) et les Mytilidae (Won *et al.*, 2003). Chez les Siboglinidae, Feldman *et al.* (1997) ont conclu que l'association symbiotique semblait se constituer en fonction du biotope plutôt que de l'espèce hôte. Ainsi trois espèces bactériennes ont été décrites. La première est hébergée par différentes espèces hôte colonisant les sources hydrothermales basaltiques. La seconde est retrouvée chez des espèces hôte vivant au niveau des suintements froids et la troisième est uniquement hébergée par une espèce de ver (*Escarpia spicata*) colonisant les carcasses de baleines. Chez les Mytilidae, Won *et al.* (2003) ont décrit deux espèces hôte (*Bathymodiolus azoricus* et *Bathymodiolus puteoserpentis*) de la Ride Medio Atlantique hébergeant des bactéries sulfuroxydantes possédant le même ribotype d'ARNr 16S. Ces deux espèces hôtes sont réparties au Nord ou au Sud de la Ride avec une zone de chevauchement au niveau du site de Broken Spur.

Selon les auteurs, l'ARNr 16S a permis au sein de ces deux modèles de corrélérer la diversité symbiotique avec des facteurs géographiques ou environnementaux. Néanmoins, la résolution de ce marqueur ne permettait pas la visualisation de variations génétiques à l'intérieur des « clades géographiques » ou des « clades environnementaux » définis, alors même que les espèces hôtes y étaient différentes. D'autres analyses de diversité plus fines utilisant d'autres marqueurs ou techniques ont donc été utilisées. Ces dernières ont permis de mettre en évidence une diversité de souches non décelable par l'utilisation de l'ARNr 16S. C'est ainsi que le marqueur ITS (Internal Transcribed Spacer), région transcrite de l'ARN ribosomal située entre les ARNr 16S, 23S ou 5S a été utilisé.

DIVERSITE BACTERIENNE

Chez les Siboglinidae, l'utilisation du marqueur ITS a permis de mettre en évidence une diversité génétique des symbiotes corrélée aux distances géographiques et non plus aux biotopes (Di Meo *et al.*, 2000). Ainsi chez ces vers tubiformes l'ARNr 16S révèle une diversité répartie en fonction de l'habitat et l'ITS une diversité génétique liée à la localisation géographique. Les auteurs en ont conclu que différents facteurs pouvaient ainsi affecter la diversité des symbiotes de vestimentifères. Néanmoins, l'utilisation de ce marqueur ITS ne révélait pas de diversité de souches au sein d'environnements proches ou identiques. Les auteurs ont donc eu recours à la REP-PCR (Repetitive-Extragenic Palindrome PCR) qui a permis de mettre en évidence une diversité de souches bactériennes influencée de façon simultanée par trois facteurs : le genre auquel appartient l'hôte, le type d'habitat et la localisation géographique. L'hôte semble être le premier facteur influençant la diversité des symbiotes, ceux hébergés par des hôtes de même genre formant un clade particulier. A l'intérieur de ces clades, les symbiotes se différencient ensuite selon le type d'habitat ou la géographie. Dès lors, au sein des deux clades liés aux biotopes définis par l'ARNr 16S (*i.e.* sources hydrothermales et suintements froids) il existerait quatre groupes de symbiotes qui se constituent selon le genre auquel appartient l'hôte, puis selon le biotope ou la localisation géographique.

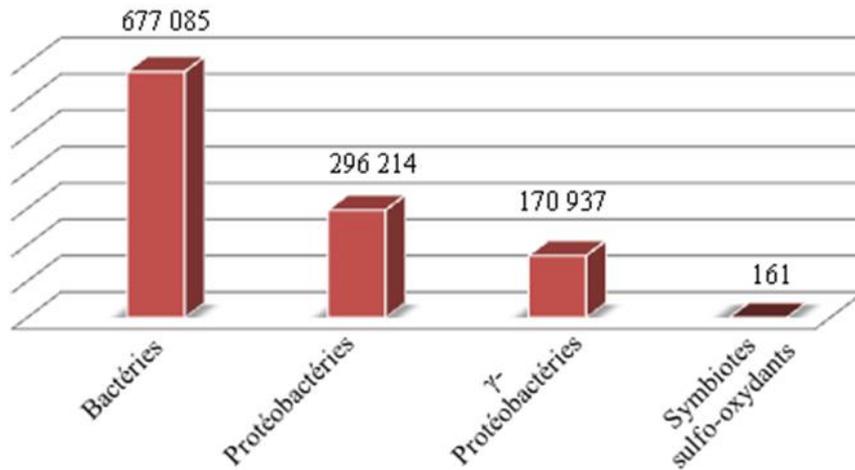
Chez les Mytilidae, le même marqueur ITS a permis de caractériser trois souches bactériennes différentes (*sym-az*, *sym-pu1* et *sym-pu2*) réparties en deux lignées (*az* pour *B. azoricus* et *pu* pour *B. puteoserpentis*). Ces deux lignées correspondent parfaitement pour l'une (*az*) à la zone nord de la Ride Medio Atlantique où est retrouvée *B. azoricus* et pour l'autre (*pu*) à la zone Sud où l'on rencontre plutôt *B. puteoserpentis*. Au niveau du site de Broken Spur, les hôtes sont essentiellement associés avec une seule souche bactérienne (*sym-pu1*) avec quelques rares cas de bi-infections (*sym-az/sym-pu1*). Nous retrouvons ainsi, au niveau intra-spécifique, un patron d'association ayant une composante environnementale mais avec également une spécificité liée à l'hôte en cas de coexistence de deux souches symbiotiques sur le même site.

Dans ces deux modèles, l'utilisation de l'ARNr 16S dépeint donc une diversité bactérienne relativement faible et liée à l'environnement (Nord/Sud de la Ride Medio Atlantique pour les Mytilidae et type d'habitat pour les vestimentifères). Par contre l'emploi de techniques plus fines met en évidence une diversité de souches influencée certes par l'environnement mais aussi par la diversité d'hôtes hébergeant ces symbiotes.

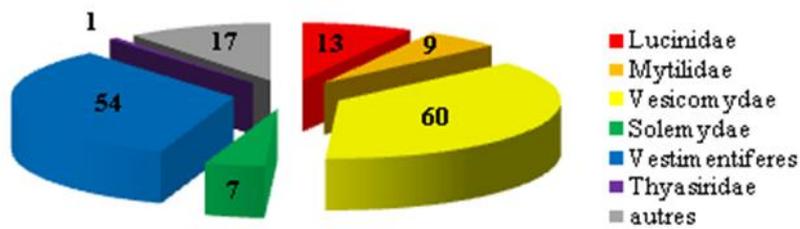
Ces deux associations, même si elles sont plutôt retrouvées dans des environnements profonds (*e.g.* sources hydrothermales), présentent certaines similitudes avec le modèle Lucinidae. En effet, comme chez les lucines, le symbiote n'est pas transmis verticalement mais est plutôt acquis à partir de l'environnement (Nussbaumer *et al.*, 2006; Won *et al.*, 2003), les formes libres des symbiotes de vers tubiformes ayant même été décrites dans la colonne d'eau à proximité des sources hydrothermales (Harmer *et al.*, 2008). De fait, dans le cas des Lucinidae, il pourrait exister une diversité intra-spécifique qui serait structurée en fonction de l'environnement, du biotope ou des hôtes. C'est pourquoi j'ai analysé les symbiotes de six espèces hôtes de Lucinidae (*Anodontia alba*, *Divaricella quadrisulcata*, *Codakia orbicularis*, *Codakia orbiculata*, *Codakia pectinella* et *Linga pensylvanica* ; Cf. p. 33) dans le but de mettre en évidence cette éventuelle diversité intra-spécifique. Pour ce faire, j'ai développé des marqueurs qui ont été utilisés dans une approche MLST (Multi-Locus Sequence Typing). Cependant, au début de cette étude les bases de données étant relativement pauvres en séquences de symbiotes de Lucinidae (Fig. 15), la première partie du travail a été consacrée au choix de marqueurs appropriés et à l'obtention de leurs séquences.

RECHERCHE DE MARQUEURS DE DIVERSITE.

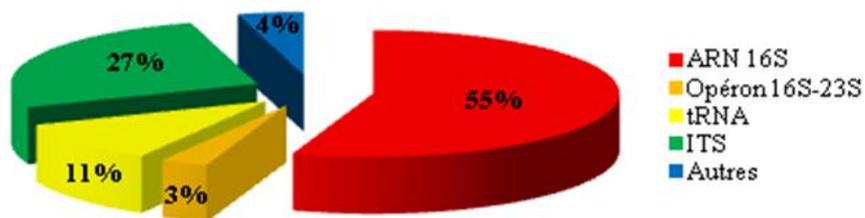
Un intérêt tout particulier a été apporté à cette partie de l'analyse, le choix des marqueurs étant un facteur essentiel. En effet, un mauvais choix de marqueur pourrait conduire à une mauvaise estimation de la diversité. Selon Cooper & Feil (2004), les marqueurs utilisés couramment ou convenant bien aux analyses MLST peuvent se classer en trois catégories : (i) Les gènes de ménage, qui sont des gènes ubiquitaires et impliqués dans des fonctions essentielles telles que la transcription ou la traduction. En général le taux d'évolution de ces gènes est assez bas. (ii) Les « core metabolism genes », qui sont présents dans un groupe donné et participent essentiellement au métabolisme central du groupe que l'on veut étudier. Ces gènes évoluent de façon plus ou moins rapide. (iii) Les hypervariables qui peuvent ne pas être ubiquitaire dans le groupe étudié et qui évoluent très vite. Ils correspondent souvent à des protéines de surface et peuvent intervenir dans la virulence des micro-organismes pathogènes.



Nombre de séquences bactériennes dans la base de données du NCBI (www.ncbi.nih.nlm.gov).



Répartition par familles d'espèces hôte des différentes séquences nucléotidiques de symbiotes sulfo-oxydants disponibles dans la base de données du NCBI.



Répartition des différentes séquences nucléotidiques de symbiotes sulfo-oxydants de Lucinidae présentes dans la base de données du NCBI (www.ncbi.nih.nlm.gov).

Figure 16. Exploration des bases de données.

Dans cette étude, les gènes candidats ont été choisis dans ces 3 groupes. Ainsi l'*ITS1* (situé entre les ARNr 16S et 23S) a été choisi comme marqueur hypervariable. L'APS Reductase (caractéristique des sulfo-oxydantes) et la RubisCO (propre aux chimioautotrophes) ont été retenus comme « core housekeeping genes ». Concernant les gènes de ménage nous avons choisi des gènes qui ont déjà été utilisés au cours d'analyses de diversité bactérienne. Les candidats retenus à partir de la littérature sont présentés Tableau G. Néanmoins, eu égard à leur ubiquité, ces derniers ont été soumis à une analyse critique permettant de les valider ou non pour l'étude du groupe qui nous intéresse (*i.e.* les symbiotes sulfo-oxydants). Ainsi ces marqueurs provenant de la littérature devaient répondre à 3 critères qui nous semblent essentiels pour être qualifiés de « bon marqueur de diversité » dans le cadre de notre étude: (i) Variabilité supérieure à l'ARNr 16S, (ii) Absence de transferts horizontaux, (iii) Présence de séquences conservées encadrant des séquences hypervariables.

DEMARCHE EXPERIMENTALE.

ECHANTILLONNAGE.

Pour la recherche des marqueurs appropriés, des individus adultes de *Codakia orbicularis* (coquille de 40mm environ) ont été collectés en Guadeloupe (Îlet Cochon [16°12'53.76"N 61°32'05.74"O]). En ce qui concerne l'analyse de la diversité, trois adultes d'*Anodontia alba* (~20mm), de *C. orbicularis* (~40mm), de *Codakia orbiculata* (~15mm) et de *Codakia pectinella* (~25mm) ont été collectés à la main en Guadeloupe (Fig. 17). Les 3 spécimens de *Divaricella quadrisulcata* (Orbigny, 1842), ont été collectés à la Désirade (plage des galets [16°17'46.88"N; 61°04'53.77"W]) et ceux de *Linga pensylvanica* (Linné, 1758) en Martinique (Anse Macabou [14°31'01.52"N; 60°49'00.86"W]). Les sub-adultes de *C. orbicularis* (~10mm) ont également été échantillonnés en Guadeloupe (Îlet Cochon). Tous les individus ont été collectés à l'intérieur (ou à proximité) des herbiers à *Thalassia testudinum*. Pour chaque spécimen les branchies et les tissus non symbiotiques (*i.e.* pied ou manteau) ont été conservés dans de l'éthanol absolu avant analyse.



Figure 17. Carte des zones échantillonnées pour l'analyse de la diversité intra-spécifique.

- Ilet Cochon (*Anodontia alba*, *Codakia orbicularis*, *C. orbiculata*, *C. pectinella*)
- Plage des galets (*Divaricella quadrisulcata*)
- Anse Macabou, Martinique (*Linga pensylvanica*)

Tableau G. Gènes-candidats retenus à partir de la littérature.

Candidats	Gène	Fonctions ^a	Ref. ^b
ADN Polymerase III (sous-unité α)	<i>dnaE</i>	Métabolisme des purines/pyrimidines	[1]
		Réplication de l'ADN MMR	
Chaperonine groEL (large sous-unité de groESL)	<i>groEL</i>	Recombinaison homologue	[2,3]
		Protéine chaperonne Repliement des protéines	
ADN Gyrase B	<i>gyrB</i>	Surenroulement de la double hélice	[4]
		Recombinaison	
ADN Polymérase I	<i>polA</i>	Métabolisme des purines/pyrimidines	[5]
		Réplication de l'ADN BER/NER	
		Recombinaison homologue	
Recombinase A	<i>recA</i>	Recombinaison homologue	[1,4]
ARN Polymerase (sous-unité β)	<i>rpoB</i>	Métabolisme des purines/pyrimidines	[4]
		Transcription	

^a Fonctions associées à ces gènes selon la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/genes.html>). MMR : Mismatch Repair, BER :Base Excision Repair, NER : Nucleotide Excision Repair.

^b [1] (Byun *et al.*, 1999), [2] (Casiraghi *et al.*, 2005), [3] (Tan *et al.*, 2005), [4] (Holmes *et al.*, 2004), [5] (Ardell *et al.*, 2003).

VALIDATION DES MARQUEURS DE DIVERSITE.

Nous avons testé les marqueurs choisis à partir de la littérature selon les critères définis ci-dessus. (i) Variabilité du marqueur supérieure à celle de l'ARNr 16S : à partir d'une matrice d'identité en « pairwise deletion » un pourcentage moyen de divergence interspécifique (basé sur un alignement multiple de dix gamma-protéobactéries [Annexe 2]) et

DIVERSITE BACTERIENNE

un pourcentage moyen de divergence intra-spécifique (à partir de deux alignements multiples de dix souches d'*Escherichia coli* et quatre de *Legionella pneumophila* [Annexe 2]) ont été estimés. (ii) Absence de transferts horizontaux : des arbres phylogénétiques ont été reconstruits par Maximum de Vraisemblance pour chacun des gènes en utilisant un alignement multiple de 28 bactéries [Annexe 3]. (iii) Présence de régions conservées et de régions variables : un alignement de dix gamma-protéobactéries (Annexe 2) a été importé dans SVARAP 2.0 (Colson *et al.*, 2006) afin de pouvoir visualiser la variabilité du gène le long de sa séquence (fenêtre non glissante de 50 nucléotides). Afin de tester les transferts horizontaux à l'intérieur du groupe des γ -protéobactéries, un Au-test (ref) a été réalisé. Ce dernier testant la vraisemblance d'un arbre selon des séquences données. A l'aide de TREE-PUZZLE v5.2 (option « -wsl » avec un model d'évolution HKY+ Γ), les topologies de nos marqueurs ont été confrontées à un alignement de 10 séquences de γ -protéobactéries. De fait les relations entre espèces et le positionnement de ces dernières les unes par rapport aux autres (qui sont définis par l'ARNr 16S) ont pu être testés pour les différents marqueurs pouvant attester de l'existence d'éventuels transferts horizontaux.

PREPARATION DE L'ADN ET CONSTRUCTION DES AMORCES SPECIFIQUES ET DEGENEREES.

L'ADN a été extrait comme décrit précédemment à partir des branchies pour les symbiotes et à partir de tissus dépourvus de symbiotes (*i.e.* pied ou manteau) pour les hôtes (Cf. page 54). Les amorces dégénérées et spécifiques utilisées pour ce travail sont détaillées Tableau H. Les amorces dégénérées ont été déterminées en utilisant un alignement de dix gamma-protéobactéries et le logiciel SVARAP 2.0 donnant site à site les proportions relatives de chaque nucléotide. Les amorces spécifiques ont été déterminées en utilisant le logiciel Primer3 ([<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>] Rozen and Skaletsky, 2000).

OBTENTION DES SEQUENCES DE SULFO-OXYDANTES POUR LES MARQUEURS VALIDES.

Nested-PCR : Une fois les marqueurs validés, le but a été d'obtenir les séquences de ces gènes pour les symbiotes sulfo-oxydants de Lucinidae. Nous avons donc utilisé une approche de PCR emboîtée avec amorces dégénérées (Annexe 4). Cette PCR est réalisée en deux étapes à partir de l'ADN extrait de *C. orbicularis*. La première étape est réalisée dans 25 μ L utilisant les amorces « nested » (Tableau H) et 10 à 25ng d'ADN. La seconde amplification est réalisée dans les mêmes conditions avec les amorces « degN » au lieu des

« nested » et 1µL de produit de l'amplification précédente dilué 100 à 1000 fois. Les températures optimales d'amplification pour chaque couple d'amorces sont déterminées par PCR à gradient (Températures d'hybridation comprises entre 46 et 60°C). Le produit de PCR obtenu est ensuite contrôlé sur gel d'agarose à 1%.

Clonage : Les fragments d'intérêt sont élués après dépôt de 100µL de produit de PCR provenant de la seconde amplification (5x20µL). Pour ce faire, la bande d'intérêt est découpée du gel puis un SPINX est réalisé (Spin-X®, Costar). L'ADN récupéré est ensuite précipité sur la nuit à -20°C par ajout d'Acétate de Sodium (3M) et d'éthanol 100%. Le tout est culotté par centrifugation (30 min à 11000 g), puis lavé 2 fois à l'éthanol 70% (15 min à 11000 g). Le culot est séché au SpeedVac concentrator (Savant) pendant 15 min et l'ADN est resuspendu sur la nuit à +4°C dans 50 à 100µL d'eau bi-distillée « RNase/DNase free ». Le clonage est réalisé à l'aide du kit pGEM®-T vector system (Promega) selon les recommandations du fabricant.

Transformation : Des bactéries *Escherichia coli* Dh5-α compétentes sont transformées par choc thermique (50 sec à 42°C) avec 2µL de produit de ligation. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB agar + ampicilline (100mg/mL) + Xgal (25mg/mL) + IPTG (25mg/mL). Les clones positifs (clones blancs) sont ensuite criblés par PCR pour : (i) la taille de l'insert : une PCR avec les amorces SP6 et T7 du vecteur est réalisée, le résultat attendu étant un fragment de la taille du fragment élué plus 130 pb (distance entre ces 2 amorces sur le vecteur « fermé »). (ii) la séquence : deux PCR sont réalisées avec l'amorce SP6 du vecteur et l'amorce sens ou anti-sens « degN » utilisée. Le résultat attendu étant une amplification dans un cas et pas dans l'autre.

Séquençage : Les clones positifs sont ensuite mis en culture sous agitation sur la nuit à 37°C dans 5mL de milieu LB additionné d'ampicilline (0,1mg/mL). Les plasmides sont ensuite extraits grâce au kit Nucléospin® Plasmid (Macherey-Nagel) et directement séquencés (COGENICS, www.cogenics.com).

AMPLIFICATIONS PAR PCR

Après obtention des séquences des bactéries sulfo-oxydantes et validation de ces dernières, des amorces spécifiques ont été définies et utilisées pour les PCR spécifiques. Ces PCRs sont réalisées dans 50µL avec 5µL de Tampon Taq 10X (Invitrogen), 3mM de MgCl₂

DIVERSITE BACTERIENNE

(Invitrogen), 0,4mM de chaque dNTP, 1mM de chaque amorce, une unité de Recombinant Taq DNA Polymérase (Invitrogen) et 25 à 50 ng d'ADN. Les gènes des hôtes (ARNr 18S et 28S) sont amplifiés de la même façon. Tous ces produits de PCR sont directement séquencés (GATC biotech, www.gatc-biotech.com)

ANALYSE PHYLOGENETIQUE

L'analyse phylogénétique est réalisée comme décrit lors de l'étude de la diversité inter-spécifique (Cf. page 56).

ANALYSE DU POLYMORPHISME

Les séquences de symbiotes obtenues pour chaque marqueur ont été alignées afin de visualiser le nombre de sites polymorphes. L'analyse des haplotypes a ensuite été réalisée grâce au logiciel DNAsp4 (Rozas *et al.*, 2003), les réseaux ayant été obtenus à l'aide de NETW4510© (Fluxus Technology Ltd.) en utilisant la méthode de Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999).

ANALYSE DES SEDIMENTS GRACE AU GENE DNAE

Du sable provenant de la couche supérieure des herbiers à *T. testudinum* de l'Îlet Cochon a été collecté. L'ADN total a été extrait selon Zhou *et al.* (1996) et une PCR emboîtée en trois étapes a été réalisée à partir de 50ng d'ADN et les amorces « nested » (Tableau G). Ce produit de PCR dilué 100 fois a servi de matrice pour la seconde amplification réalisée avec les amorces « degN » (Tableau H) et cette procédure a été répétée une dernière fois avec les amorces spécifiques. Le fragment d'intérêt a été élué à partir d'un gel d'agarose 1% en utilisant le Nucleospin® Extract II kit (Macherey-Nagel) et cloné avec le kit pGEM-T® TA cloning kit (Promega). Les vecteurs ont ensuite été utilisés pour transformer des *Escherichia coli* Dh5 α compétentes (Promega) et les plasmides des clones positifs ont été collectés en utilisant le Nucleospin® plasmid kit (Macherey-Nagel). Les inserts ont ensuite été directement séquencés (Genome express, www.gexbyweb.com).

Tableau H. Amorces utilisées au cours de l'étude de la diversité intra-spécifique.

	Amorces		Conditions		
	Noms	Séquences (5'→3')	Gène cible	Tm ^b	Ref ^c
Hôtes	18S-5'f	CTGGTTGATYCTGCCAGT	ARNr	54°C	1
	18S-1100r	CTTCGAACCTCTGACTTTGG	18S		2
	28S_LSU-900f	CCGTCTTGAAACACGGACCAAG	ARNr	52°C	3
	28S_LSU-1600r	AGCGCCATCCATTTTCAGG	28S		2
	16Suniv-27f	AGAGTITGATCMTGGCTCAG	<i>rrs</i>	54°C	4
	16Suniv-1492r	TACGGYTACCRRGTTACGACIT			
	ITSdegN_1242f	GCTACACACGTGCTACAATGG	<i>ITS1</i>	54°C	5
	ITSdegN_196r	TCTCGGTTGATTTCTTTTCTT		58°C	
	ITS_Symb-282f	GGAGTGGGTTGXAAAAGAAG			
	ITS_Symb-954r	ATCGCAAGCTACAACGTCCT			
Symbiotes ^a	dnaEnested-1069f	CCDGTDDGGICCDGGICGYGGC	<i>dnaE</i>	46°C	5
	dnaEnested-2279r	TGNGATTTTRTTRAANCCRTA		60°C	
	dnaEdegN-1180f	CCIGARCGKGTITCIATGCC		64°C	
	dnaeEdegN-2076r	YTGCATNACYTGTYTCYTGRTA	<i>gyrB</i>	56°C	5
	dnaE-Symb-201f	GAAGATGATCCCCTTCGAGA		56°C	
	dnaE-Symb-810r	GTAGGAGACCTTGGCACGAC		58°C	
	gyrBnested-217f	GHAARCGYCCDGGYATGTA	<i>gyrB</i>	56°C	5
	gyrBnested-1809r	CVACRTCVCATCBGTCAT			
	gyrBdegN-277f	GGTDTTYGARRTDGTDGATAA			
	gyrBdegN-1590r	CHGCNGARTCMCCYTCMAC	<i>gyrB</i>	58°C	5
	gyrB-Symb-185f	AGCCACCCGAAGAGAAGAA			
	gyrB-Symb-1150r	TGGCAGACCGGCTATGT			
		CBBL-1B	CACCTGGACCACVGTBTGG	<i>cbbL</i>	60°C
	CBBL-2C	CGGTGYATGTGCAGCAGCATGCCG			
	aprA-Symb-23f ^d	GCAACGACCTGATGGGTATC	<i>aprA</i>	58°C	5
	aprA-Symb-555r ^d	GTCGGTACGAAGCGGTTTT			

^a Les amorces « nested » et « degN » correspondent aux amorces dégénérées utilisées en PCR emboîtée. Les amorces « symb » correspondent aux amorces spécifiques dessinées à partir des séquences obtenues.

^b Les températures d'hybridation optimales ont été obtenues par PCR à gradient

^c [1] (Winnepenninckx *et al.*, 1998), [2] (Williams *et al.*, 2003), [3] (Olson *et al.*, 2003), [4], [5] cette étude, [6].

^d Ces amorces ont été dessinées en utilisant les séquences spécifiques de symbiotes de Lucinidae obtenues par une approche dérivée du « TE-walking » (Piednoel and Bonnivard, 2009 [Annexe 3]) à partir d'une séquence « core » obtenue avec les amorces APS-FW/APS-RV (Deplancke *et al.*, 2000).

Afin de tester les séquences obtenues, une sonde spécifique du marqueur *dnaE* (Sym*dnaE*-HRP414, 5'-GGCCAACGGGGAGGGATTG-3') a été utilisée en double CARD-FISH sur des fractions purifiées de symbiotes de *C. orbicularis*. Les symbiotes ont été purifiés selon Caro *et al.* (2007). Une goutte de cette fraction purifiée a été déposée sur lame Superfrost® (Menzel-Glazer®) et fixée à la chaleur. Les lames ont ensuite été traitées comme dans le chapitre précédent (Cf. page 38). Une première hybridation a été ensuite réalisée avec la sonde Sym_*dnaE*-HRP414 selon Pernthaler *et al.* (2002) jusqu'au Tampon de lavage. Une seconde hybridation a ensuite été réalisée avec symco2A, sonde spécifique de l'ARNr 16S de ces symbiotes (Gros *et al.*, 1996). Ces lames ont ensuite été rincées 2 fois en PBS 1X (15 min à RT) et incubées dans une solution d'Amplification Buffer ($1/10$ [w/v] dextrane sulfate, 1X PBS, 2M NaCl, $1/100$ [v/v] 10% Blocking reagent), H₂O₂ diluée à 0,5% dans du PBS 1X et 2µL de tyramide marquée fluorescente pendant 15 min à 37°C dans l'obscurité. Les sections ont ensuite été lavées en PBS 1X (15 min à RT), séchées, contre-colorées au DAPI et montées en milieu DAKO avant observation avec un microscope fluorescent epi80i (NIKON, France).

RESULTATS

VALIDATION DES MARQUEURS

Variabilité des marqueurs : Dans le but de tester ce critère un indice de variabilité inter et intra-spécifique des gènes a été évalué. Ce dernier correspond à la divergence moyenne calculée à partir d'un alignement de 12 γ -protéobactéries (niveau inter-spécifique [Annexe 2]). L'indice de variabilité intra-spécifique a lui été évalué sur les souches de deux γ -protéobactéries : *Escherichia coli* et *Legionella pneumophila* (Annexe 2). On observe (Fig. 16) que la variabilité des différents marqueurs est comprise entre 30 et 40% alors que celle de l'ARNr 16S est d'environ 15%. En ce qui concerne le niveau intra-spécifique, on observe également que le gène de l'ARNr 16S est moins variable que ce soit pour les souches d'*Escherichia coli* ou de *Legionella pneumophila*. Ce gène possède 0,6% de variabilité pour les souches d'*E. coli* et à peine 0,1% pour les souches de *L. pneumophila* (Fig. 17). Dans le même temps les marqueurs candidats varient d'environ 1% à 1,8% pour *E. coli* et de 1% à

2,5% pour *L. pneumophila* (Fig. 17). Tous les candidats semblent de fait correspondre aux besoins de notre analyse.

Absence de transferts horizontaux : A partir d'un alignement multiple de 28 bactéries (Annexe 2), une phylogénie moléculaire en Maximum de Vraisemblance a été réalisée pour chaque marqueur candidat et comparée à la phylogénie moléculaire basée sur l'ARNr 16S (Fig. 18). Celle-ci permet de définir les groupes bactériens et les relations entre espèces à l'intérieur de ces groupes et servira donc de référence pour l'analyse des différents marqueurs. On observe sur les différentes phylogénies (Fig. 19) que tous les grands groupes monophylétiques définis par la phylogénie de l'ARNr 16S sont retrouvés pour tous les marqueurs candidats à l'exception de *groEL*. En effet pour ce gène on observe par exemple que les cyanobactéries ou les β -protéobactéries sont polyphylétiques. Suite à l'Au-test (Tableau I, test statistique comparant les topologies de deux phylogénies ; Shimodaira, 2002), on observe que les topologies de *dnaE*, *gyrB*, *polA*, et *recA* correspondent de façon significative à l'ARNr 16S. On retrouve donc au sein de ces marqueurs des signatures qui semblent être caractéristiques de l'espèce et qui permettent de replacer les espèces bactériennes les unes par rapport aux autres.

Présence de régions conservées et de régions variables : La nécessité d'avoir des régions conservées encadrant des régions variable a également été un critère de validation de nos marqueurs candidats. Ainsi, un alignement de 12 gamma-protéobactéries a été importé dans le logiciel SVARAP 2.0 afin de visualiser la variabilité des différents candidats le long de leur séquence. On observe ainsi que chaque candidat possède ces régions conservées, qui permettront de définir des amorces dégénérées. Ces régions conservées sont encadrées par des régions variables qui mettront en évidence l'éventuelle diversité génétique recherchée.

Tableau I. Résultats de l'Au-test.

Topologie ^a	ARNr 16S	<i>dnaE</i>	<i>groEL</i>	<i>gyrB</i>	<i>polA</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>
Classement	Meilleur	5ème	6ème	2ème	4ème	3ème	7ème
Au ^b	0,866	0,130	0,016	0,273	0,243	0,270	0,001

^a topologies comparées à celles de l'ARNr16S

^b p-values

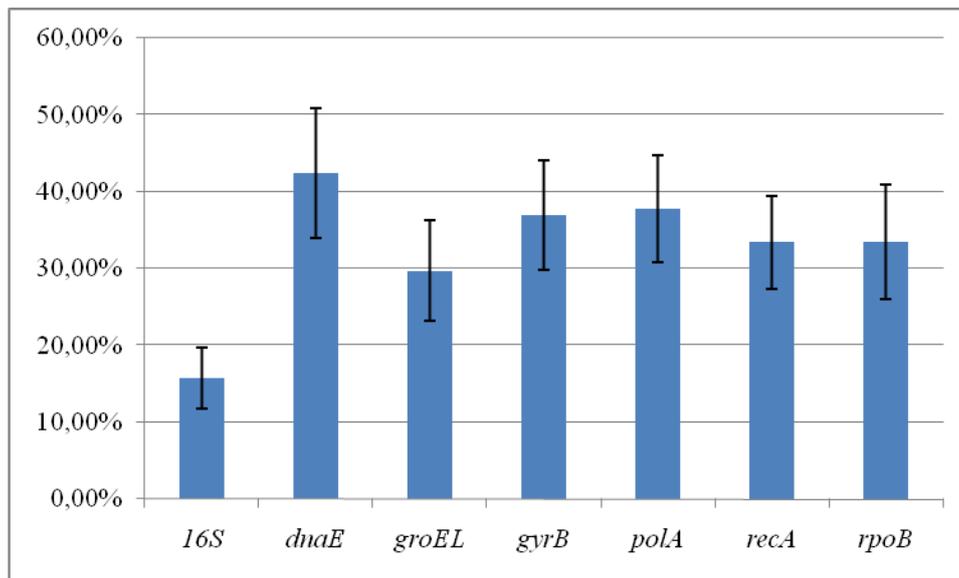


Figure 18. Indice de variabilité inter-spécifique des différents gènes candidats comparés à celui de l'ARNr 16S.

Au vu des résultats précédents les marqueurs choisis pour l'analyse ont été : la sous unité alpha de l'ADN polymérase III (*dnaE*), l'ADN Gyrase B (*gyrB*), l'ADN polymérase I (*polA*) et la Recombinase A (*recA*).

OBTEINION DES SEQUENCES DES MARQUEURS RETENUS POUR L'ANALYSE

recA : Un fragment obtenu à la taille attendue a été séquencé. Cette séquence présentait une identité nucléotidique (sur 500 pb) de 98% avec la recombinaise A d'*Escherichia coli* O157:H7 [TaxID : 83334]. De nouvelles amorces ont donc été dessinées. La séquence obtenue grâce à ce nouveau couple d'amorces ne présentait aucune identité nucléotidique avec les séquences des bases de données. Aucune amorce spécifique n'a pu ainsi être dessinée pour ce marqueur.

polA : Un premier fragment séquencé présentait une identité nucléotidique de 79% (76pb sur un fragment de 711) avec l'ADN Polymerase I de *Bordetella pertussis* Tohama I. Un second jeu d'amorces a permis l'amplification de 800 paires de bases présentant 60 % d'identité avec l'ADN Polymérase de *Acinetobacter* sp. ATCC27244 [TaxID : 525244]. Des amorces spécifiques ont pu ainsi être déterminées à partir de cette séquence.

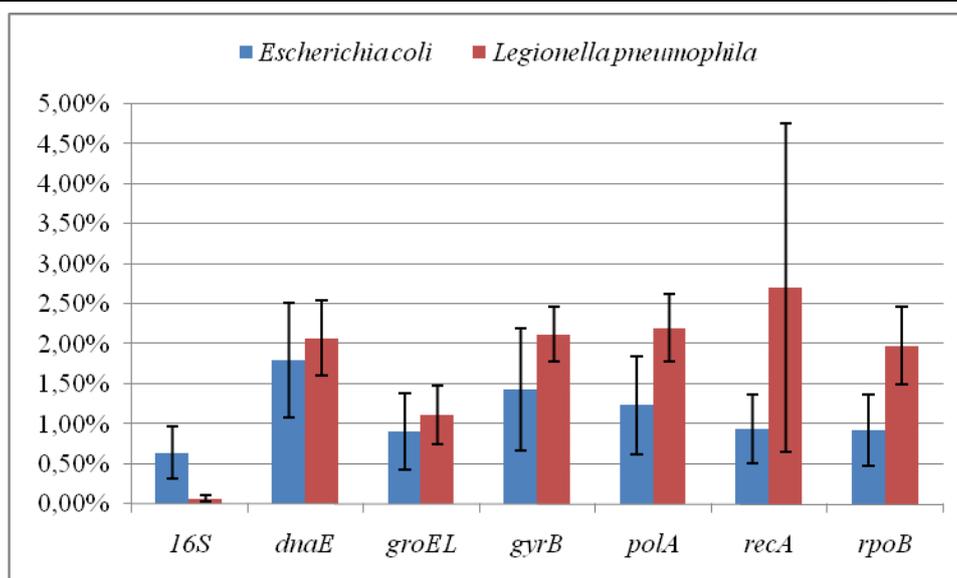


Figure 19. Indice de variabilité intra-spécifique des différents gènes candidats comparés à celui de l'ARNr 16S pour différentes souches d'*Escherichia coli* et de *Legionella pneumophila*.

dnaE, et *gyrB*: Concernant ces deux gènes la première amplification PCR a permis l'obtention de fragments à la taille attendue. Les séquences de ces derniers présentaient une identité de séquence de 75% avec *Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7* [TaxID : 396588] pour *dnaE*, et de 85% *Allochromatium vinosum DSM180* [572477] pour *gyrB*. Des amorces spécifiques ont ainsi pu être déterminées pour ces différents marqueurs

VALIDATION DES SEQUENCES OBTENUES

Afin de s'assurer que les séquences obtenues à partir des branchies de *C. orbicularis* correspondaient bien au symbiote de ce dernier nous avons vérifié ces séquences par analyse phylogénétique et par CARD-FISH. Selon les différentes phylogénies nos séquences appartiennent bien aux gamma-protéobactéries hormis pour l'ADN polymérase I dont la séquence amplifiée appartient à un groupe non défini. De plus, les résultats d'hybridation *in situ* réalisées sur des fractions purifiées de symbiotes de *C. orbicularis* avec une sonde spécifique du marqueur *dnaE* attestent bien que les symbiotes possèdent la séquence amplifiée. La vérification de séquence par hybridation *in situ* n'a pas été réalisée pour les autres marqueurs candidats.

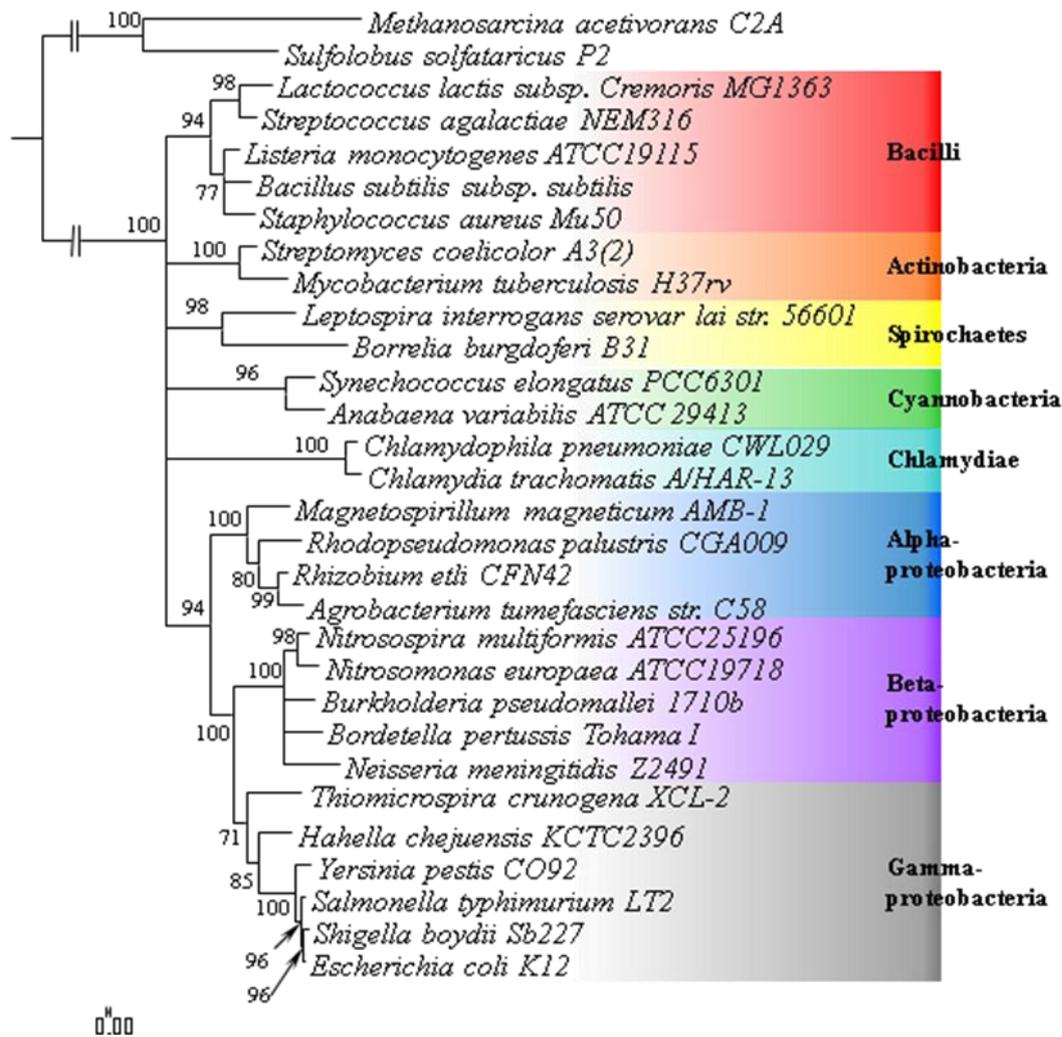


Figure 20. Phylogénie moléculaire des bactéries basée sur des séquences d’ARN ribosomal 16S (1354 sites). Cet arbre a été reconstruit par Maximum de Vraisemblance avec comme modèle d’évolution le TrN+I+Γ. Les archées ont été utilisées comme groupe extérieur. La robustesse des différents nœuds a été évaluée par bootstrapp et seules les valeurs supérieures à 70% sont affichées.

ANALYSE DES SEQUENCES D’ARNR 16S

Toutes les amplifications PCR réalisées à partir des branchies d’*A. alba*, *C. orbicularis*, *C. orbiculata*, *C. pectinella*, *D. quadrisulcata* et *L. Pensylvanica* ont permis l’obtention d’une séquence unique d’ARNr 16S après analyse des chromatographes. Ces séquences présentent une identité nucléotidique moyenne de 99,7% (1466 pb).

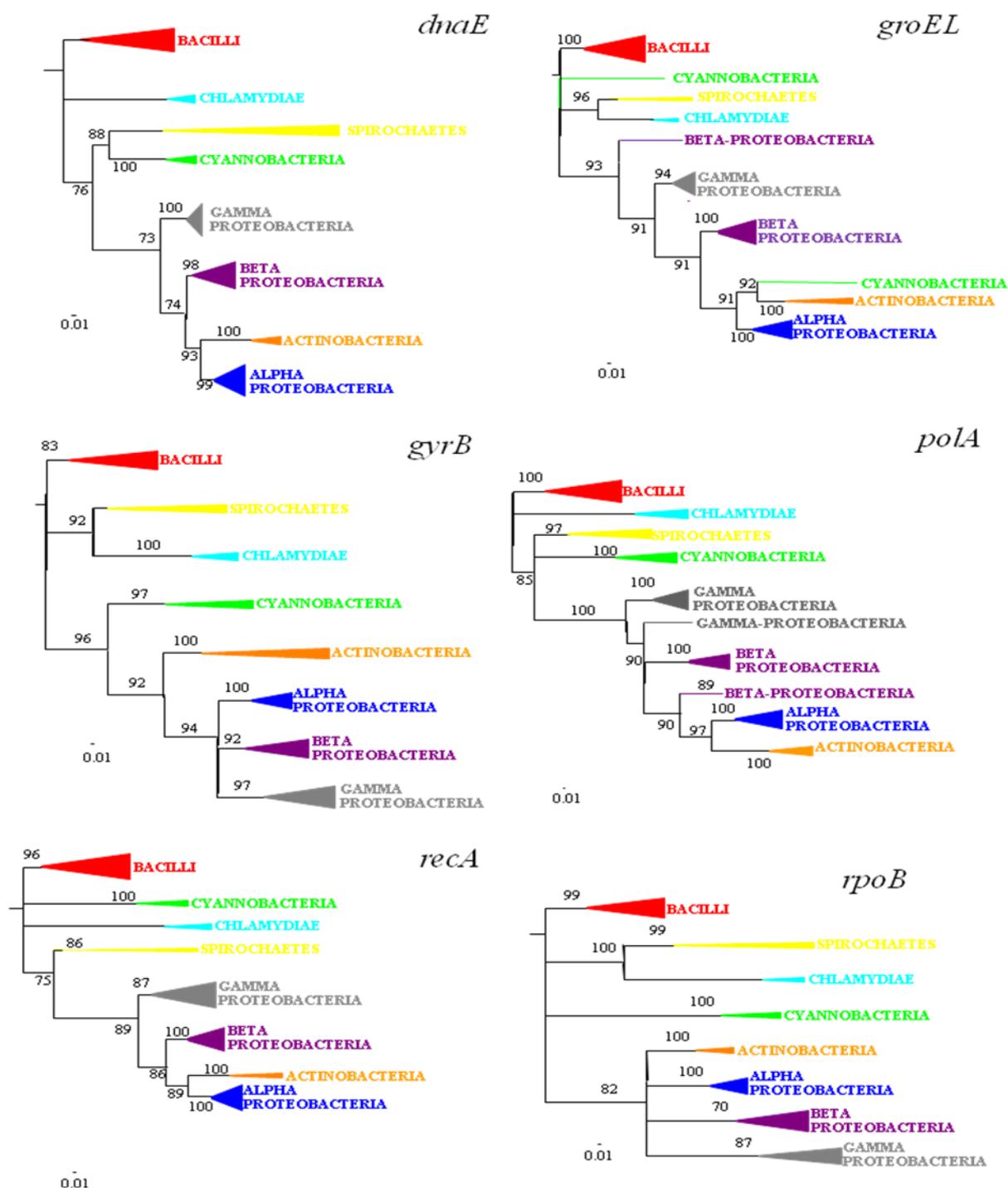


Figure 21. Phylogénies moléculaires des bactéries basées sur des séquences des différents marqueurs candidats (*dnaE* : 1630 sites ; *groEL* : 1521 ; *recA* : 906 ; *gyrB* : 1473 ; *polA* : 2059 ; *rpoB* : 2604). Ces arbres ont été reconstruits par Maximum de Vraisemblance avec comme modèles d'évolution SYM+I+ Γ (*dnaE*, *recA* et *gyrB*), K80+I+ Γ (*polA*) et GTR+I+ Γ (*groEL* et *rpoB*) Les archées ont été utilisées comme groupe extérieur.

Pour toutes les amplifications des ARNr 18S et 28S, une amplification unique à la taille attendue (respectivement ~1000 pb et ~700 pb) a été observée. Les Crassatellidae et les Thyasiridae qui sont groupes frères des Lucinidae ont été choisis comme groupe extérieur. Selon cet arbre phylogénétique (Fig. 20), nos échantillons sont retrouvés dans les différents clades décrits par Williams *et al.* (2003). Le clade Anodontia pour *A. alba*, le clade A pour *C. orbicularis* et *C. orbiculata* et le clade B pour *C. pectinella*, *D. quadrisulcata* et *L. pensylvanica*. Pour *A. alba* et *C. orbicularis* les séquences obtenues ici correspondent à celles publiées par Williams *et al.* (2003).

ANALYSE DU POLYMORPHISME DES SYMBIOTES.

Un total de 18 séquences par marqueur a été obtenu et le polymorphisme observé est présenté Tableau J. Après alignement de ces séquences, 6 sites polymorphes sur 465 ont été observés pour *dnaE*, 6/806 pour *gyrB*, 11/512 pour *ITS1* 8/492 pour *aprA* et 11/600 pour *CbbL*. On note au total environ 1,5% de sites polymorphes. L'*ITS1* constitue le marqueur le plus variable (2,14%) et les gènes de métabolisme *aprA* et *cbbL* sont plus variables que les gènes de ménage *dnaE* et *gyrB* (respectivement 1,62%, 1,83%, 1,29% et 0,74%). Selon les réseaux d'haplotypes (Fig. 21) réalisés pour chacun des cinq marqueurs sur 18 individus (trois par espèce hôte), différents haplotypes sont observés (entre cinq et six selon le marqueur) révélant une diversité bactérienne intra-spécifique. De façon intéressante sauf pour *ITS1* l'haplotype majoritaire ne semble pas être l'haplotype ancestral à partir duquel les autres haplotypes seraient dérivés. De plus les différents haplotypes ne semblent pas être distribués aléatoirement. En effet, il semblerait qu'il y ait un lien entre haplotype bactérien et espèce hôte (Fig. 21).

Les trois sub-adultes de *C. orbicularis* (coquilles d'environ 5 mm de long) hébergent le même haplotype symbiotique que les adultes. Les séquences de *dnaE*, *gyrB* et *aprA* présentent 100% d'identité avec celles des adultes. Enfin le séquençage de *dnaE* a également été réalisé sur la couche supérieure de sédiment comprise entre 0 et 5 cm de profondeur. Le séquençage de cinq clones montre une séquence correspondant au symbiote de *C. orbicularis* (une différence sur 465 pb). Les quatre autres clones semblent correspondre à des séquences bactériennes différentes de celles hébergées par les lucines colonisant les herbiers à *T. testudinum* de l'Îlet Cochon (identité nucléotidique moyenne de 83% avec le symbiote de *C.*

orbicularis). Enfin le séquençage de *dnaE* réalisé sur de *C. orbicularis* et *C. orbiculata* de Martinique révèle que ces deux individus hébergent des symbiotes différents de ceux retrouvés en Guadeloupe (respectivement deux et quatre différences sur 465 pb).

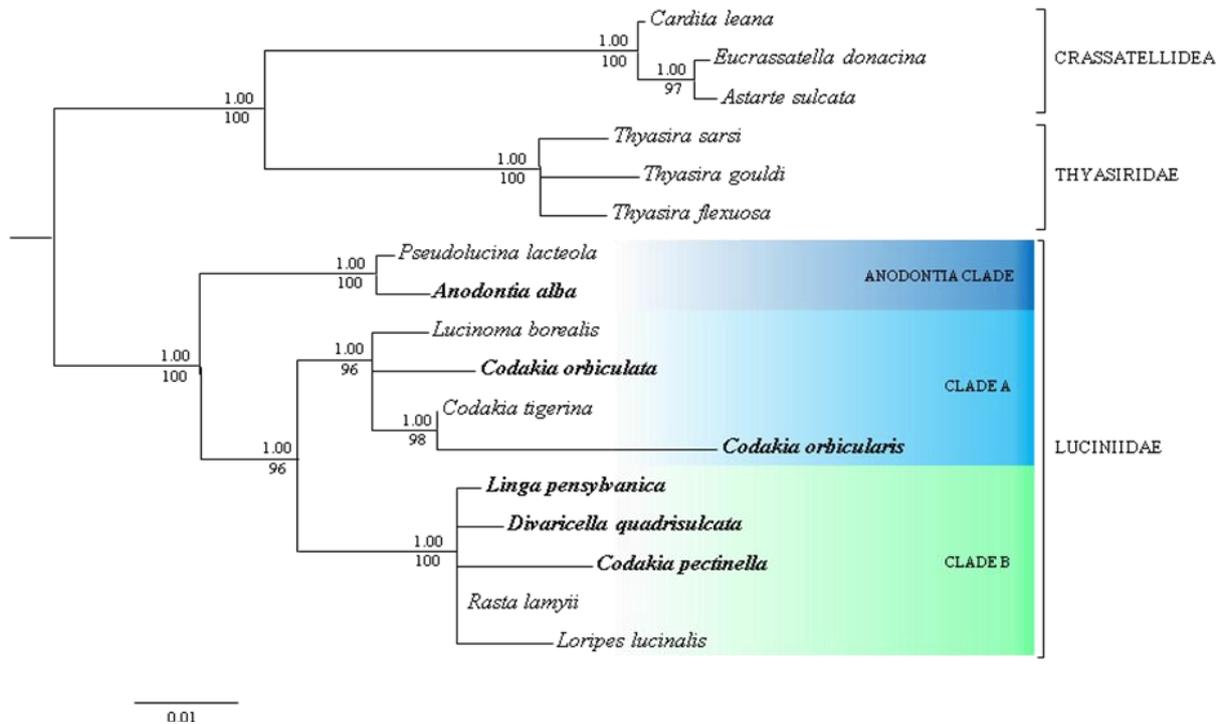


Figure 22. Phylogénie moléculaire des Lucinidae réalisée après concaténation des séquences des ARNs ribosomiaux 18S et 28S (1386 sites).

Cet arbre a été reconstruit par Maximum de Vraisemblance (MV) et Inférence Bayésienne (BI) avec comme modèles d'évolution le TrNef+ Γ (ML) et le K80+ Γ (BI). Les Crassatellidae et Thyasiridae comme groupes extérieurs. La robustesse des différents nœuds a été évaluée et seules les valeurs de bootstrap (ML, 100 répétitions [en dessous des branches]) et les probabilités postérieures (BI, runs=5, générations=1 000 000, échantillonnage=1 000, burn=10% [au-dessus des branches]) supérieures à 95% sont affichées. Les séquences en gras correspondent aux séquences obtenues lors de cette étude et les autres à des séquences tirées de Williams *et al.* (2003).

DIVERSITE BACTERIENNE

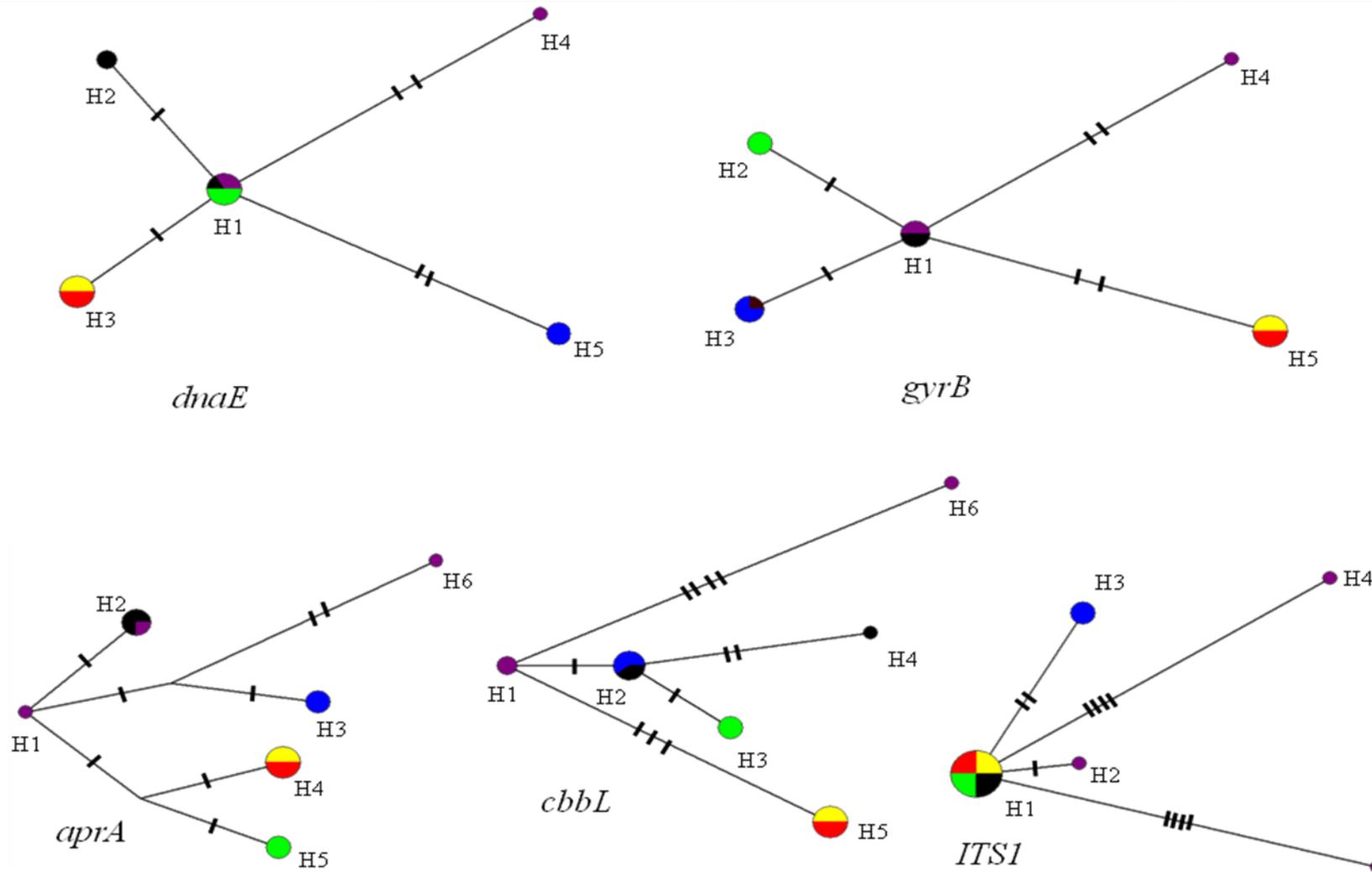


Figure 23. Réseaux d'haplotypes reconstruits à partir des séquences obtenues pour chacun des marqueurs. Les réseaux ont été reconstruits par la méthode de Median Joining. Les cercles correspondent aux différents haplotypes (HA à H6). La taille de ceux-ci représentent le nombre de séquences pour chaque haplotype. La couleur des cercles représente l'espèce hôte hébergeant ces séquences bactériennes. Bleu pour *C. orbicularis*, vert pour *L. pensylvanica*, rouge pour *C. pectinella*, jaune pour *C. orbiculata*, violet pour *A. alba* et noir pour *D. quadrisulcata*. Les barres sur les branches représentent une substitution.

Tableau J Analyse du polymorphisme.

Gene ^a	Sequences		Sites	Haplotypes
	Nb	Taille (pb)	Polymorphes ^b	
<i>dnaE</i> (~3,5 kb)	18	465	6 (1.29 %)	5
<i>gyrB</i> (~2,4 kb)	18	806	6 (0.74 %)	5
<i>ITS1</i> (~550 pb)	18	512	11 (2.14 %)	5
<i>aprA</i> (~1 kb)	18	492	8 (1.62 %)	6
<i>cbbL</i> (~1,5 kb)	18	600	11 (1.83 %)	6
TOTAL	90	2875	42 (1.46 %)	

^a Noms des gènes. *dnaE*: sous-unité alpha de l'AND Polymérase III, *gyrB*: AND Gyrase B, *ITS1*: 16S/23S Internal Transcribed spacer, *aprA*: sous-unité alpha de l'Adenylyl,5-bisPhosphate Redctase, *cbbL*: Grande sous-unité de la Ribulose-1,5-bisPhosphate Carboxylase/Oxygenase Large subunit.

^b Les pourcentages représentent la proportion de sites polymorphes par rapport à la taille du fragment considéré.

DISCUSSION

Le but de cette étude était de mettre en évidence une diversité génétique des symbiotes sulfo-oxydants associés à six espèces de bivalve de la famille des Lucinidae (*A. alba*, *C. orbicularis*, *C. orbiculata*, *C. pectinella*, *D. quadrisulcata* et *L. pensylvanica*) colonisant les herbiers à *T. testudinum* des Antilles Françaises. En effet, ces six espèces hôte hébergent la même espèce bactérienne sur la base du séquençage de l'ARNr 16S. Considérant ce marqueur insuffisamment résolutif comme cela a été démontré chez les Siboglinidae (Di Meo *et al.*, 2000) et les Mytilidae (Won *et al.*, 2003), j'ai cherché cette potentielle diversité chez le Lucinidae par une approche MLST. De plus *via* des réseaux d'haplotypes j'ai cherché à savoir si cette diversité bactérienne intra-spécifique était structurée ou pas en fonction de la diversité des hôtes, de la localisation géographique ou de composantes environnementales.

CHOIX ET VALIDATION DES MARQUEURS

Les bases de données étant relativement pauvres en séquences de symbiotes de Lucinidae, la première partie du travail a été de choisir des marqueurs convenant à notre étude et d'obtenir les séquences de ces marqueurs. Des marqueurs correspondant aux trois catégories de Cooper & Feil (2004): (i) gènes de ménage, (ii) gènes de « core metabolism » et

DIVERSITE BACTERIENNE

(iii) gènes hypervariables ont été choisis. Etant spécifiques du groupe étudié (*i.e.* les bactéries sulfo-oxydantes) l'APS Reductase et la RubisCO ont été retenus comme gènes de « core metabolism ». L'ITS correspond lui au marqueur hypervariable retenu. Concernant les gènes de ménage, des candidats issus de la littérature ont été choisis et testés afin de vérifier leur compatibilité avec les besoins de notre étude. Différents critères devaient donc être remplis par ces candidats pour être ou non retenus : (i) variabilité supérieure à celle de l'ARNr 16S, (ii) absence de transferts horizontaux et (iii) présence de régions conservées encadrant des régions variables. Les six gènes retenus à partir de la littérature et ainsi testé ont été : *dnaE*, *groEL*, *gyrB*, *polA*, *recA* et *rpoB*.

Variabilité supérieure à celle de l'ARNr 16S : D'une façon générale les gènes codants pour des protéines sont attendus pour être moins variables que l'ARNr 16S ce dernier étant contraint uniquement au niveau de sa structure alors que les séquences codant des protéines sont contraintes non seulement pour la structure, un changement d'acide aminé pouvant conduire à un mauvais repliement, mais aussi pour la fonction de la protéine, un changement d'acide aminé au niveau d'un site catalytique ou de reconnaissance modifiant la fonction ou rendant cette dernière non fonctionnelle. Néanmoins selon les indices de variabilité inter et intra-spécifique déterminés, *dnaE*, *groEL*, *gyrB*, *polA*, *recA* et *rpoB* se sont montrés plus variables que l'ARNr 16S.

Absence de transferts horizontaux : Ce critère est essentiel afin d'éviter de surestimer ou sous-estimer la diversité. En effet, un gène soumis à de tels transferts (*e.g.* facteurs de virulence) peut être retrouvé dans des bactéries de souches, d'espèces ou de groupes différents et conduire à une mauvaise estimation de la diversité. Au vu des différents arbres réalisés, *dnaE*, *gyrB*, *polA*, et *recA* ne semblent pas soumis à ce type de transferts leur phylogénie suivant celle de l'ARNr 16S.

Présence de régions conservées et de régions variables : Ce dernier critère relève plutôt du côté technique de la méthode utilisée ici dans la recherche de séquences. En effet, en l'absence d'informations sur le génome des symbiotes de Lucinidae des amorces spécifiques ne peuvent être déterminées. Par conséquent l'amplification par amorces dégénérées grâce à des séquences conservées chez différentes espèces reste le seul moyen (hors séquençage haut débit) pour obtenir les séquences de nos marqueurs. Il a été démontré que nos candidats possédaient des motifs conservés qui correspondaient aux séquences codantes pour différents

sites catalytiques (*e.g.* liaison à l'ADN, hydrolyse de l'ATP ...) des protéines correspondantes (Bernad *et al.*, 1990; Dalrymple *et al.*, 2001; Karlin and Brocchieri, 1996; Kim *et al.*, 1997). Entre ces régions il existe des régions moins contraintes n'intervenant ni au niveau structural ni au niveau fonctionnel, ces régions s'en retrouvent donc beaucoup plus variables.

Ainsi au vu de ces critères il apparait que seuls *dnaE*, *gyrB*, *polA* et *recA* peuvent être retenus comme marqueurs de diversité dans le cas qui nous concerne.

OBTENTION ET VERIFICATION DES SEQUENCES DES MARQUEURS RETENUS.

Afin d'obtenir les séquences de nos marqueurs correspondant aux symbiotes sulfoxydants de Lucinidae une stratégie de PCR emboîtée avec amorces dégénérées a été utilisée. Compte tenu de leur caractère dégénéré ces amorces sont sensées amplifier la majorité des gamma-protéobactéries auxquelles appartiennent les symbiotes de Lucinidae. Ainsi, le risque d'amplifier une γ -protéobactérie contaminante restait présent. Il pouvait en effet s'agir de bactéries de l'environnement (*e.g.* eau de mer, sédiments, air ambiant...) ou du bivalve lui-même (*i.e.* bactéries marines libres situées entre les filaments branchiaux). Cependant le risque principal demeurait *Escherichia coli*, γ -protéobactérie commensale et couramment utilisée au laboratoire. De fait la vérification par comparaison dans les banques de données, analyse phylogénétique et hybridation *in situ* restait indispensable.

recA : Toutes les amplifications réalisées sur ce marqueur (deux jeux d'amorces différents) ont abouti au séquençage du gène d'*Escherichia coli* O157:H7. Ce résultat peut être dû à une affinité supérieure des amorces dégénérées pour les séquences d'*E. coli* par rapport à la séquence de la recombinaise A des symbiotes de Lucinidae.

polA : Les deux amplifications réalisées ont permis l'obtention de fragments correspondant à *polA*. La première séquence ne présentait une identité nucléotidique que sur une très faible taille (76 pb sur 611 séquencées) avec *B. pertussis* qui est une β -protéobactérie. Par conséquent cette dernière a été jugée inexploitable. Concernant le second fragment d'environ 900 pb, une identité de 60% a été retrouvée sur 914 pb. Cependant l'analyse phylogénétique n'a pu confirmer avec certitude que ce fragment correspondait à une γ -protéobactérie.

dnaE, et *gyrB*: Une bande de taille attendue a été obtenue pour toutes les amplifications de ces marqueurs. Après séquençage, les fragments correspondaient bien au

DIVERSITE BACTERIENNE

gène ciblé. Les comparaisons par BLAST avec les bases de données, et les analyses phylogénétiques ont confirmé qu'il s'agissait de γ -protéobactéries. De plus l'hybridation *in situ* réalisée pour le gène *dnaE* a confirmé la présence de la séquence obtenue au sein des symbiotes de Lucinidae. Par conséquent ces trois gènes, le marqueur hypervariable *ITS1* et les gènes de métabolisme *cbbL* et *aprA* ont été retenus pour l'analyse de la diversité intra-spécifique des symbiotes associés aux Lucinidae des Antilles Françaises et les séquences de 18 individus ont été obtenues.

L'ANALYSE MLST REVELE UNE DIVERSITE GENETIQUE CHEZ LES SYMBIOTES SULFO-OXYDANTS.

Cinq marqueurs ont été utilisés appartenant aux trois catégories décrites par Cooper & Feil (2004). Comme attendu *ITS1* constitue le marqueur le plus variable (Tableau J). Cependant ce dernier ne présente pas le plus grand nombre d'haplotypes, eu égard à l'accumulation des sites polymorphes dans les séquences de symbiotes d'*A. alba* (Fig. 21). Les gènes de ménage (*dnaE* et *gyrB*) sont les moins variables et les « core-métabolisme » (*aprA* et *cbbL*) présentent une variabilité intermédiaire (Tableau J). Ces résultats correspondent parfaitement à nos pré-requis (*i.e.* variabilité des marqueurs supérieure à celle de l'ARNr 16S). Ainsi, notre analyse permet la visualisation d'une diversité génétique intra-spécifique au sein des symbiotes hébergés par les six espèces de Lucinidae des Antilles Françaises.

Le polymorphisme moyen observé est de l'ordre de 1,5% ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Zhang and Hewitt, 2003). Néanmoins, cette valeur peut correspondre à une sous-estimation de la diversité eu égard à la technique employée ici (*i.e.* séquençage direct des produits de PCR). En effet, seule la séquence majoritairement présente est à chaque fois amplifiée et séquencée. De fait s'il existe au sein de ces espèces de Lucinidae une multi-infection de souches cette dernière ne sera pas forcément détectée. Ainsi, l'analyse attentive des différents chromatogrammes a permis chez un spécimen de l'espèce *Anodontia alba* la visualisation de séquences minoritaires qui pourrait bien être due à la présence de plusieurs souches bactériennes.

Se pose dès lors la question de la distribution de cette diversité. Cette dernière est-elle répartie de façon aléatoire parmi nos différents échantillons ou structurée en fonction de la diversité des hôtes, de la localisation géographique des échantillons ou du biotope où sont retrouvés ces derniers ?

Dans le but de tester l'éventuelle structuration de la diversité des symbiotes sulfo-oxydants associés aux lucines caribéennes des réseaux d'haplotypes ont été réalisés avec les séquences de nos différents marqueurs (Fig. 21). Quelque soit le marqueur considéré, la diversité bactérienne n'est pas distribuée de façon aléatoire parmi les 18 individus analysés. De plus même si les réseaux d'haplotypes ne sont pas totalement congruents le même patron est retrouvé : (i) les symbiotes d'*A. alba* sont toujours polymorphes. (ii) Les symbiotes de *D. quadrisulcata* sont polymorphes ou monomorphes selon le marqueur. (iii) Les symbiotes des 4 autres espèces sont monomorphes. Cette dernière observation atteste d'une spécificité d'association entre *L. pensylvanica* et son symbiote, entre *C. orbicularis* et le sien. De façon surprenante il semble également exister une spécificité d'association entre une souche particulière et deux espèces hôte (*C. orbiculata* et *C. pectinella*). Cette structuration de la diversité semble de plus ne pas être due à un biais d'échantillonnage. En effet, la probabilité d'obtenir au hasard une séquence bactérienne particulière pour 3 hôtes sur 18 échantillonnés, sous l'hypothèse que la capture du symbiote est réalisée dans un unique pool bactérien est de $4,6 \times 10^{-3}$.

QUELS FACTEURS SONT FACTEURS RESPONSABLES DE LA STRUCTURATION DE LA DIVERSITE ?

Il existe donc chez ces symbiotes sulfo-oxydants une diversité de souches au sein de l'espèce bactérienne partagée par les six espèces hôte des Antilles Françaises. Cette diversité n'étant pas distribuée aléatoirement j'ai cherché les facteurs expliquant la structuration de cette diversité. Dans un premier temps, j'ai donc considéré trois hypothèses correspondant aux paramètres suivants : (i) la géographie (ii) l'environnement et (iii) la phylogénie des hôtes.

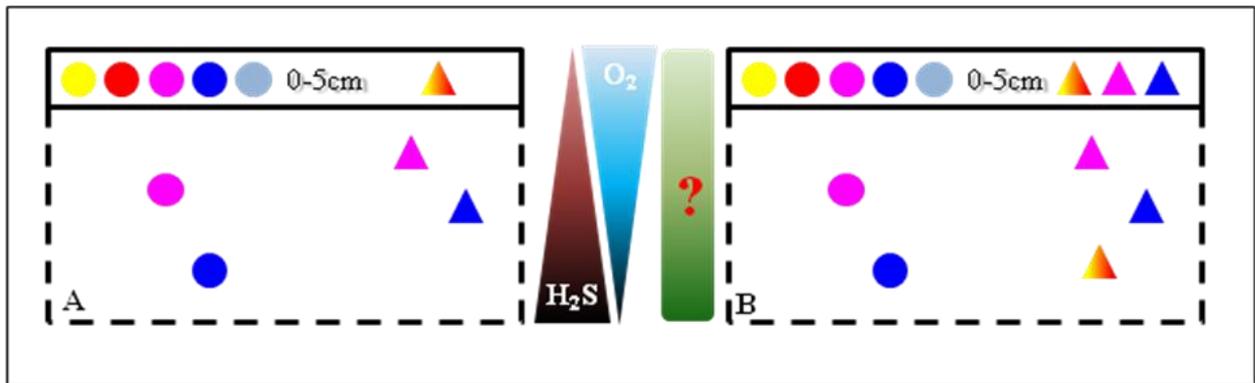


Figure 24. Représentation schématique de la distribution des hôtes et des symbiotes dans les sédiments des herbiers à *T. testudinum*.

(A) Population bactérienne structurée en fonction de la profondeur. (B) Population bactérienne non structurée. Les cercles représentent les hôtes et les triangles les formes libres des symbiotes. Les couleurs correspondent aux espèces (hôtes) ou aux souches mises en évidence par l'analyse MLST (symbiotes) : Jaune, *C. orbiculata* ; Rouge, *C. pectinella* ; Violet, *A. alba* ; Bleu, *C. orbicularis* ; Bleu clair, Juvéniles ou sub-adultes de *C. orbicularis*.

Influence de la géographie: Les 6 espèces hôte analysées provenant de 3 lieux de collecte différents (La Désirade pour *D. quadrisulcata*, la Martinique pour *L. pensylvanica* et la Guadeloupe pour *A. alba*, *C. orbicularis*, *C. orbiculata* et *C. pectinella*) la structuration peut être due à la répartition géographique de nos échantillons. En effet, *L. pensylvanica* et *D. quadrisulcata* ont été échantillonnés chacun dans des zones géographiques différentes et possèdent chacun un patron d'haplotype symbiotique qui leur est propre (polymorphisme ou non pour *D. quadrisulcata* et polymorphisme pour *A. alba*). De plus, les symbiotes des espèces hôte échantillonnées en Martinique (*C. orbicularis* et *C. orbiculata*) présentent des séquences différentes des symbiotes de Guadeloupe. Néanmoins, les 4 autres espèces qui ont été échantillonnées dans le même herbier (Îlet Cochon) ne partagent pas le même haplotype. De fait la localisation géographique ne peut être considérée comme unique composante expliquant la structuration de la diversité observée.

Dès lors, comment expliquer la structuration de la diversité des symbiotes hébergés par les 4 lucines de l'Îlet Cochon ? Deux autres hypothèses (écotype ou phylotype) peuvent être envisagées.

Hypothèse de l'écotype: Sous cette hypothèse, la population bactérienne est structurée dans l'environnement en fonction de différents paramètres environnementaux (*e.g.* gradients d' H_2S , d' O_2 ou autre) retrouvés dans les sédiments des herbiers (Fig. 22A). De fait, la structuration observée chez les hôtes ne serait que le reflet de la structuration de la population bactérienne dans l'environnement. Par conséquent, des hôtes localisés à différents niveaux de la colonne de sédiment hébergeraient des souches symbiotiques différentes. Cette hypothèse

est corroborée par l'observation des symbiotes de *C. orbiculata* et *C. pectinella*. En effet ces 2 espèces hôte ne sont localisées que dans la couche supérieure de sédiment eu égard à la taille de leur siphon (Allen, 1958), et partagent quelque soit le marqueur le même haplotype bactérien. Sous cette hypothèse, seul cet unique haplotype bactérien devrait être retrouvé dans la couche supérieure du sédiment, dans les juvéniles (ou sub-adultes) ou dans tout Lucinidae présent entre 0 et 5 cm de profondeur. Afin de valider cette hypothèse, les sédiments de la couche supérieure et les sub-adultes de *C. orbicularis* (0,5 cm de longueur) ont été analysés. Les résultats obtenus ne valident pas cette hypothèse. En effet, une séquence correspondant au symbiote de *C. orbicularis* a été détectée dans les sédiments. De plus, les sub-adultes de cette même espèce qui ont été échantillonnés dans la couche supérieure, hébergent la même souche que les adultes (selon des séquences des gènes *dnaE*, *gyrB* et *aprA*) qui sont eux distribués dans toute la colonne de sédiments et jusqu'à 20 cm de profondeur. Il semblerait donc qu'au niveau de l'Îlet Cochon la population bactérienne environnementale ne soit pas structurée en fonction de la profondeur (Fig. 22B).

Hypothèse du phylotype: Sous cette hypothèse la structuration observée serait due à la coévolution des hôtes et des souches bactériennes à partir d'un couple symbiotique ancestral. Ainsi les hôtes les plus proches phylogénétiquement devraient héberger les souches bactériennes les plus proches. Afin de tester cette hypothèse, la phylogénie moléculaire des hôtes (Fig. 20) a donc été comparée à la structuration observée (Fig. 21). On n'observe aucune congruence entre la phylogénie des hôtes et les différents réseaux d'haplotypes. En effet les deux hôtes hébergeant la même souche bactérienne (*C. orbiculata* et *C. pectinella* [Fig. 21, cercle rouge et jaune]) ne sont pas phylogénétiquement les plus proches. La première espèce hôte appartient au clade A des Lucinidae et la seconde au clade B (Fig. 20). Ainsi, l'hypothèse du phylotype peut ici être rejetée.

Ainsi, dans le cas des six Lucinidae que j'ai étudié ici, la géographie, la diversité des hôtes ou les conditions environnementales ne permettent pas d'expliquer la structuration de la diversité qui existe au sein de leurs symbiotes sulfo-oxydants. En effet, même si le paramètre « géographie » peut être invoqué dans le cas de *D. quadrisulcata* et de *L. pensylvanica*), il semble que d'autres facteurs interviennent lorsque différentes espèces hôtes colonisent une même localité (même lieu géographique et même biotope). Des lors, il semble que seule une spécificité d'association hôtes/souches bactériennes due à un mécanisme sélectif puisse conduire au schéma observé. Ceci sous l'hypothèse de l'accès à la ressource en symbiotes par

les hôtes. Comment envisager qu'un processus sélectif entre les hôtes et les symbiotes puissent conduire à cette structuration de la diversité?

La figure 23 propose une hypothèse qui peut expliquer la structuration observée. La première étape (Fig. 23[1]) correspond à l'état initial où 4 espèces hôte exploitent le même pool bactérien. [2] Un mutant pour les déterminants de reconnaissance apparaît dans la population bactérienne. [3] Ce dernier n'est plus reconnu par les hôtes. De fait la population de ce nouveau mutant augmente en cas d'avantage sélectif de la « vie libre » par rapport à la « vie associée ». Ainsi, sous l'hypothèse du recrutement environnemental, l'échappement à la capture (et donc à l'impasse évolutive) semble expliquer l'augmentation de la proportion de ce nouveau mutant dans l'environnement. [4] Apparition d'individus hôte capables de reconnaître cette nouvelle forme du symbiote. [5] Ces individus exploitant à la fois l'ancien et le nouveau pool bactérien leur proportion augmente tout naturellement au sein de la population hôte eu égard au bénéfice pour l'hôte (Cf chapitre I). [6] Une nouvelle association peut se constituer si : (i) la taille de la population bactérienne environnementale est relativement faible. En effet dans ce cas, les hôtes mutants étant les seuls à exploiter ce nouveau pool bactérien, ces derniers ne sont pas en compétition avec d'autres espèces hôtes pour la ressource bactérienne. (ii) La nouvelle association confère un avantage sélectif le nouveau symbiote étant plus efficace (e.g. fixation du carbone). Ainsi, la spécialisation pour une souche donnée intervient *via* le mécanisme de choix de partenaire (Sachs *et al.*, 2004). [7] Des mutants pour des caractères non impliqués dans la reconnaissance peuvent également apparaître et continuent dans ce cas à être capturés par les hôtes. Ce cas particulier explique de fait la présence de symbiotes polymorphes au sein de certains individus (e.g. cas d'*A. alba*). En effet, nos marqueurs ne sont pas impliqués dans la reconnaissance et sont supposés neutres, la structuration observée révèle une sélection des déterminants de reconnaissance qui par autostop, sélectionnerait également les allèles de nos marqueurs. Ce schéma, s'il correspond à la réalité, renforce une fois de plus l'hypothèse du recrutement environnemental par rapport à la transmission environnementale. En effet, aucune évidence ne permet d'observer sous l'hypothèse de la transmission les étapes [3] et [6]. Ainsi, sous cette dernière, la bactérie qui s'échappe lors de l'étape [3] ne donnera pas de descendants sauf si elle est capable de se multiplier dans l'environnement. Enfin lors de l'étape [6], les hôtes « réensemencant » l'environnement *via* le relargage il est peu probable que l'association tende à se constituer avec une souche différente.

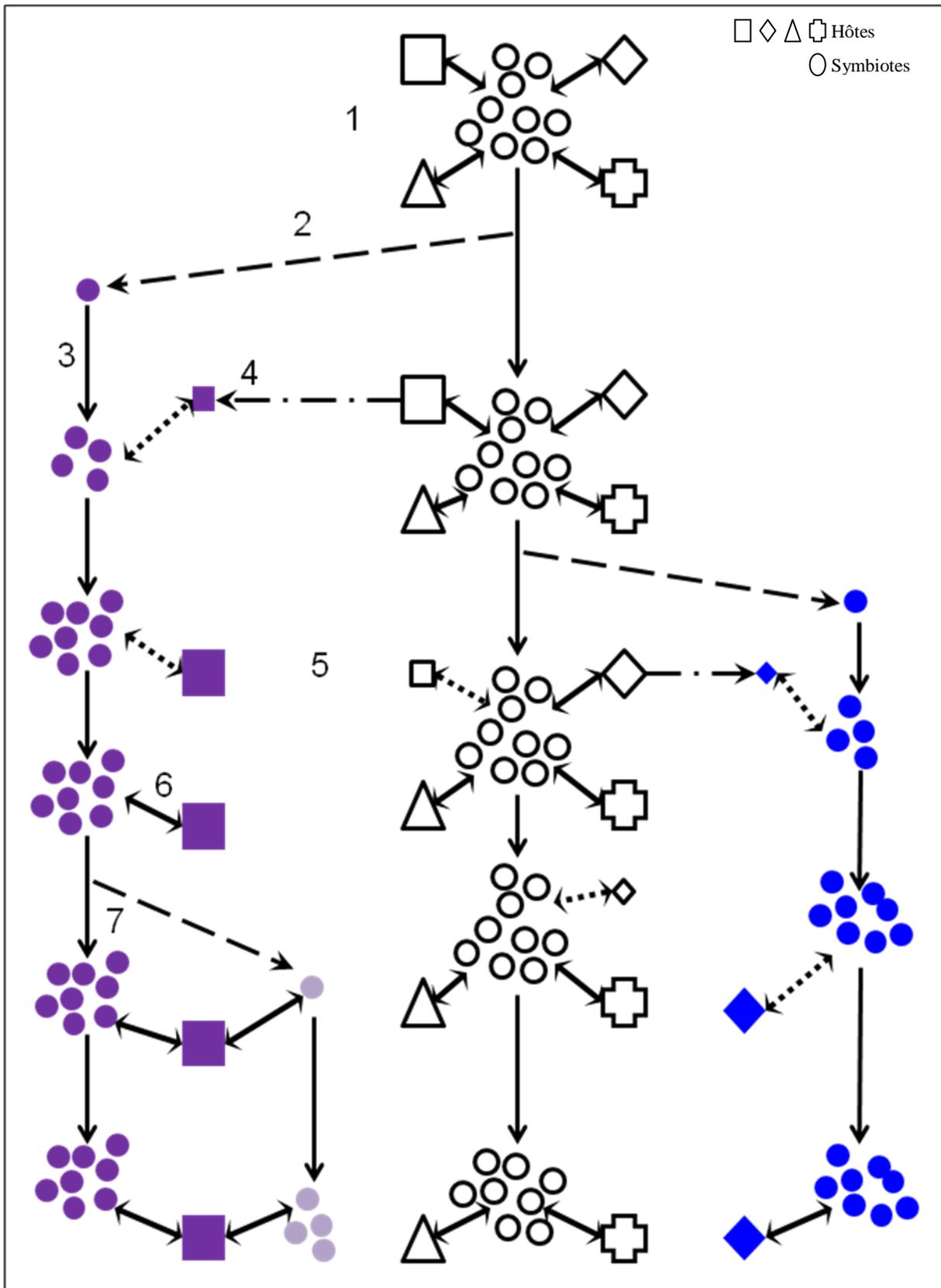


Figure 25. Représentation schématique du processus évolutif pouvant conduire à la structuration de la diversité bactérienne observée dans les herbiers à *T. testidunum* de l'Îlet Cochon.

DIVERSITE BACTERIENNE

Une hypothèse alternative à ce scénario évolutif peut également être proposée pour expliquer le patron d'association spécifique observé au sein de l'îlet Cochon. Cette dernière ne fait intervenir que le choix du partenaire et constituerait une réponse de l'hôte à l'environnement (Fig. 26). Sous cette hypothèse 4 espèces hôtes s'associent à différentes souches bactériennes présentes dans l'environnement (1). Selon les conditions environnementales, certaines espèces hôtes étant plus adaptées à certaines souches bactérienne (ces dernières ne s'associent durablement qu'à la souche bactérienne qui lui conférerait un succès reproductif accru (2).

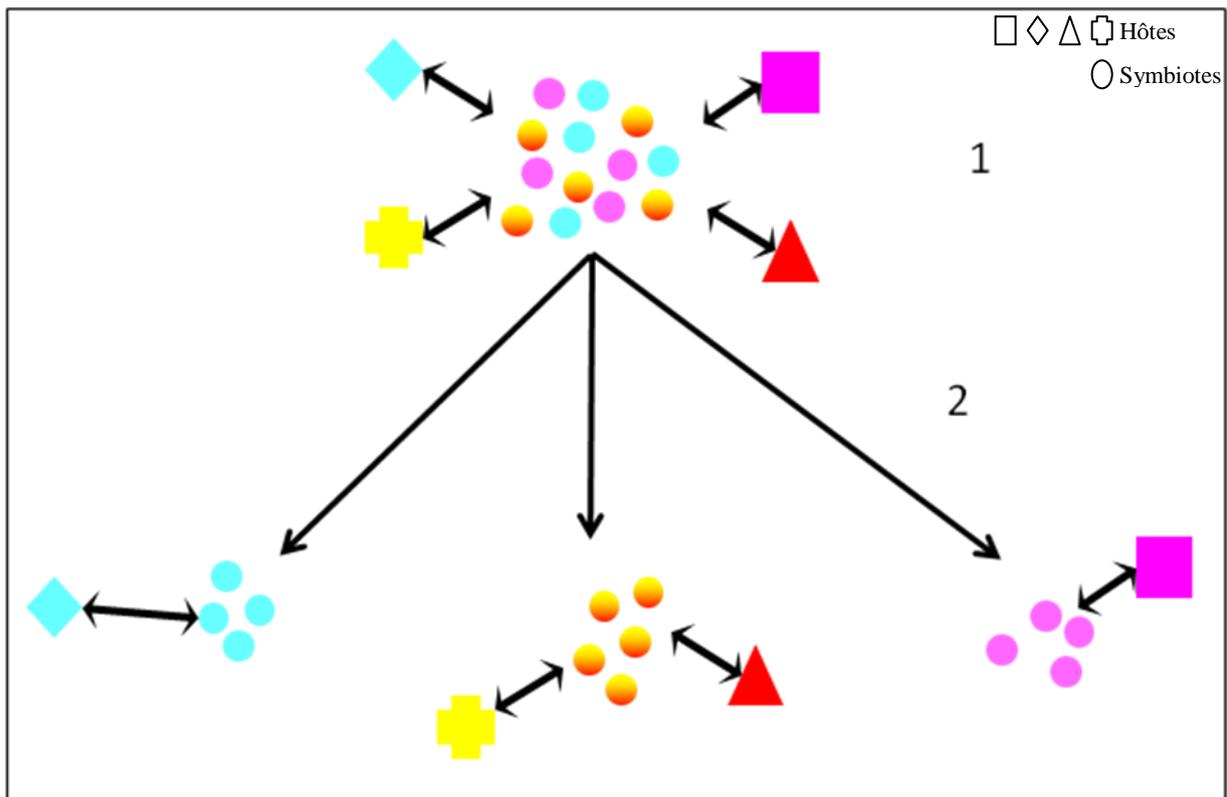


Figure 26. Représentation schématique du choix du partenaire.

SPECIFICITE D'ASSOCIATION

L'analyse de la diversité des symbiotes associés aux Lucinidae a permis de mettre en évidence une diversité interspécifique relativement faible. Cependant de plus fines analyses ont révélé au sein des lucines colonisant les herbiers à phanérogames des Antilles Françaises une diversité de souches bactériennes jusque là insoupçonnée. Cette diversité n'est pas aléatoirement distribuée au sein des hôtes mais plutôt structurée selon différents paramètres. Ainsi, la diversité génétique intraspécifique observée au sein de cette espèce bactérienne semble être liée à la répartition géographique des hôtes (*e.g.* Martinique, la Désirade). En effet, les souches hébergées diffèrent selon la localisation de l'espèce hôte qui les héberge. Néanmoins, au niveau local, des hôtes différents colonisant le même herbier n'abritent pas la même souche bactérienne. Il existe, en effet, au niveau de l'îlet Cochon des associations spécifiques entre hôtes et souches bactériennes. Cette spécificité d'association ne semble pas être due à une co-évolution des partenaires à partir d'associations ancestrales. L'environnement n'influe pas non plus sur la diversité symbiotique car au sein de ces herbiers la population bactérienne est constituée de différentes souches mais sans structuration particulière. Dès lors, seul un processus local de co-évolution antagoniste de type Reine-Rouge basée sur l'hypothèse de « gene-for-gene » semble pouvoir expliquer le patron de structuration observé ici. On peut émettre l'hypothèse qu'à chaque gène de reconnaissance de l'hôte correspondrait un gène cible chez le symbiote. L'évolution de ces déterminant permettant tantôt au symbiote d'échapper à l'hôte, tantôt à ce dernier de capturer ces nouveaux symbiotes. De fait, les associations spécifiques ainsi constituées devraient pouvoir se constituer et se défaire au cours du temps. Sous un tel modèle les associations observées aujourd'hui doivent présenter une spécificité telle qu'un hôte associé à une souche particulière ne puisse s'associer qu'à (ou préférentiellement à) cette dernière. Il existerait alors au sein des hôtes des mécanismes de reconnaissance et de sélection de la souche qui leur seraient propre, et donc un contrôle au niveau intra-spécifique de l'acquisition du symbiote.

SPECIFICITE D'ASSOCIATION

L'éventualité d'un contrôle intra-spécifique lors de l'acquisition du symbiote par les Lucinidae est une hypothèse qui a précédemment été proposée par Gros *et al.* (2003a). Cette dernière hypothèse suppose l'existence au sein de l'espèce bactérienne partagée par les six hôtes des Antilles Française d'une diversité de souches. En effet il pourrait ne pas y avoir de contrôle intra-spécifique mais simplement inter-spécifique, chaque hôte s'associant à toutes les souches appartenant à l'espèce bactérienne associée à ces hôtes. Dans ce cas, la mise en contact artificielle d'individus d'une espèce hôte avec une fraction purifiée de symbiotes provenant des cinq autres espèces hôte aboutirait dans tous les cas à l'infection des juvéniles (Fig. 24A). Dans le cas inverse, celui d'un contrôle intra-spécifique il ne devrait y avoir acquisition du symbiote que si et seulement si les individus d'une espèce hôte donnée sont mis en contact avec des symbiotes provenant de spécimens de cette même espèce hôte (Fig 24B). Ces auteurs ont donc testé ces hypothèses en réalisant des infections de juvéniles asymbiotiques (*i.e.* spécimens obtenus au laboratoire et n'ayant jamais été en contact avec des symbiotes). L'infection de juvéniles de *C. orbicularis* par des fractions purifiées de symbiotes provenant des six espèces hôte citées précédemment (*A. alba*, *C. orbicularis*, *C. orbiculata*, *C. pectinella*, *D. quadrisulcata* et *L. pennsylvanica*) a donc été réalisée. Ces juvéniles ont été mis au contact des symbiotes purifiés durant 1 mois sans changement d'eau avec inoculation à T₀ et T₀+15j. Les branchies des différents individus ont ensuite été disséquées et contrôlées en Microscopie Electronique à Transmission (MET). L'expérience a montré que les juvéniles de *C. orbicularis* étaient capables d'acquérir sans distinction les symbiotes des six espèces hôte testées. Pour ces auteurs ceci suggérerait, chez les Lucinidae, une absence de discrimination de la bactérie au niveau intra-spécifique, la discrimination n'intervenant qu'au niveau interspécifique bactérien. Cependant compte tenu des données à la disposition de ces auteurs (2003) ces résultats pouvaient également suggérer tout simplement une absence de diversité de souches au sein de l'espèce symbiotique associée à ces six espèces de Lucinidae

L'analyse MLST réalisée au cours de mon travail de thèse a permis de rejeter l'hypothèse d'une absence de diversité intra-spécifique du symbiote. Il n'y aurait donc pas de discrimination intra-spécifique lors de l'acquisition du symbiote sur la base des résultats de Gros *et al.*(2003a). Cependant, l'analyse MLST a également révélé une structuration entre souches bactérienne/espèce hôte. C'est pourquoi j'ai donc également réalisé une expérience d'infections sur des adultes aposymbiotiques (débarrassés de leurs symbiotes après un jeûne de 9 mois) de *C. orbiculata*. Ces individus ont été mis en contact avec des fractions purifiées

de symbiotes provenant de *C. orbicularis* ou *C. orbiculata* fraîchement collectés. L'expérimentation a été conduite durant 15 jours avec mise en contact tous les deux jours et analyse des spécimens par hybridation *in situ* tous les quatre jours. Ainsi, après quatre, huit, 12 ou 15 jours, la présence de symbiotes n'est observée que dans les branchies d'adultes mis en contact avec des fractions purifiées de symbiotes provenant de *C. orbiculata* (Fig. 25). Par ailleurs les analyses moléculaires réalisées sur ces fractions purifiées révèlent uniquement la présence de l'haplotype détecté chez *C. orbiculata* par l'analyse MLST. Il semble donc que seule la souche spécifiquement associée à *C. orbiculata* (Fig. 21, cercles jaunes) soit capable d'infecter les adultes de *C. orbiculata*. Il y aurait donc contrôle intra-spécifique lors de l'acquisition du symbiote par les adultes.

Comment expliquer l'existence d'un contrôle intra-spécifique pour la reconnaissance de la souche associée chez les adultes de *C. orbiculata* alors que ce contrôle semble ne pas avoir lieu chez les juvéniles de *C. orbicularis* ? La première hypothèse serait liée à l'espèce hôte considérée. Ainsi *C. orbicularis* ne contrôlerait pas au niveau intra-spécifique les symbiotes qu'elle capture à l'inverse de *C. orbiculata*. Ceci semble peu vraisemblable car tous les individus analysés (trois adultes et trois juvéniles) provenant des herbiers de l'Îlet Cochon hébergeaient le même haplotype bactérien. Cette espèce s'associerait donc elle aussi de façon spécifique à « sa » souche bactérienne. Une autre hypothèse serait celle d'une plasticité d'infection différente selon le stade qui serait due à la plasticité du filament branchial au cours du développement des hôtes et durant les phases d'infection. Sous cette hypothèse la « capacité d'acquisition » ne serait pas la même entre les juvéniles et les adultes.

Même si tous les Lucinidae analysés à ce jour possèdent dans leurs branchies des symbiotes sulfo-oxydants, cette association n'est pas physiologiquement obligatoire. En effet, il est possible d'obtenir des sub-adultes non symbiotiques au laboratoire et la présence du symbiote n'est pas obligatoire pour la métamorphose (Gros *et al.*, 1997). Cependant, en cas de non-infection, même si les branchies sont fonctionnelles et possèdent une zone ciliée et une zone intermédiaire normales comme montré chez *C. orbicularis* (Gros *et al.*, 1998b), la zone latérale apparaît tronquée, avec des filaments branchiaux courts. Tous les types cellulaires (*i.e.* mucocytes cellules à grains et cellules intercalaires) sont présents à l'exception des bactériocytes. Un quatrième type cellulaire, les cellules indifférenciées, est néanmoins observé chez ces individus asymbiotiques (Gros *et al.*, 1998b). Ces dernières cellules correspondent aux précurseurs des bactériocytes. En effet, suite à l'endocytose des symbiotes

SPECIFICITE D'ASSOCIATION

au niveau du pôle apical de ces cellules indifférenciées, ces dernières se retrouvent colonisées et se différencient en bactériocytes.

Aucun bactériocyte en division n'ayant été observé, le suivi du filament branchial pendant les phases d'infection, de purge ou de réinfection a également été réalisé afin de comprendre la dynamique des branchies de Lucinidae au cours ces différentes phases (N. Elisabeth, com. Pers.). Durant les phases de purge, les bactériocytes ne disparaîtraient pas mais réduiraient simplement de taille. Par ailleurs, durant les phases de réinfection il n'y aurait pas de production *de novo* des bactériocytes mais plutôt augmentation du volume cellulaire des bactériocytes déjà présents.

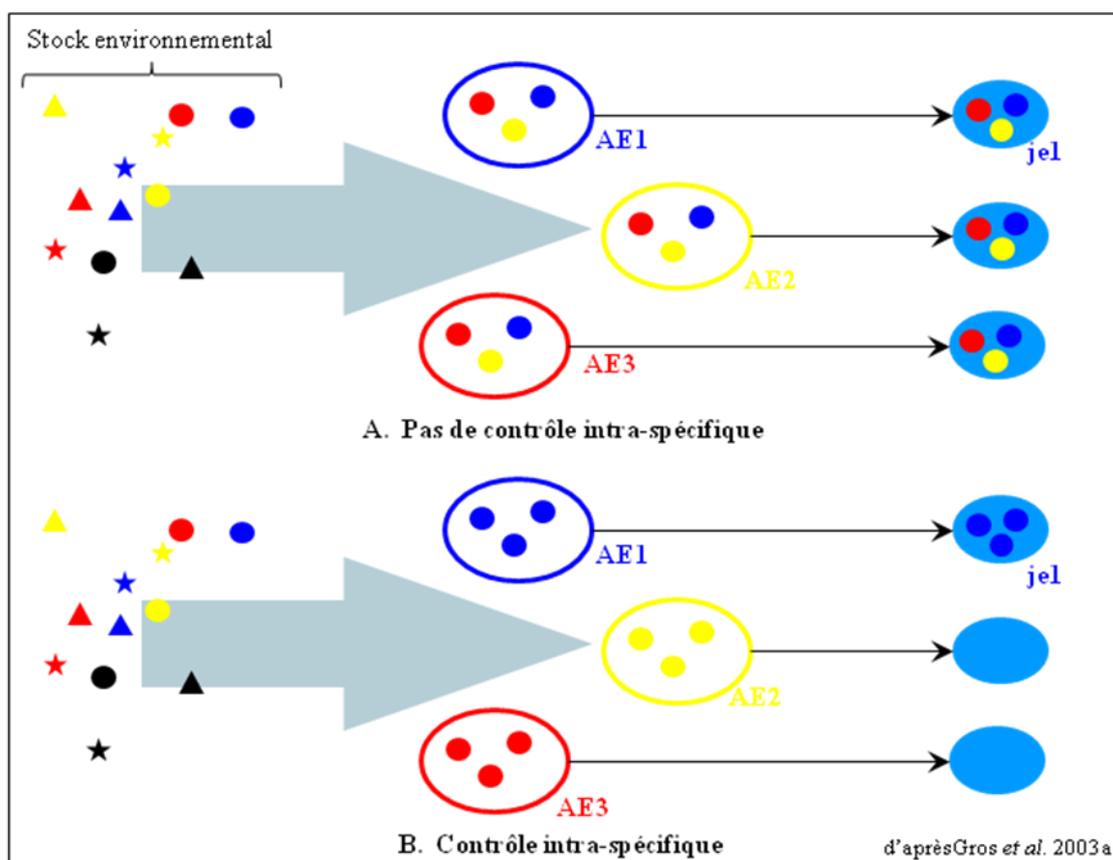


Figure 27. Hypothèses de contrôle de l'acquisition du symbiote par l'hôte selon (Gros *et al.*, 2003a).

(A) Absence de contrôle intra-spécifique : Toutes les souches de l'espèce bactérienne à laquelle appartiennent les symbiotes de Lucinidae sont reconnues et acquises par les hôtes. Les juvéniles d'une espèce donnée se retrouvent infectés quelque soit la fraction purifiée mise en contact. (B) Contrôle intra-spécifique : Seule la souche spécifiquement associée est reconnue et acquise par une espèce hôte donnée. Ainsi les juvéniles ne sont infectés que si ils sont en contact avec une fraction purifiée provenant de la même espèce hôte. Au sein du stock libre les formes représentent les espèces bactériennes et les couleurs les différentes souches. AE1, AE2 et AE3 représentent les adultes des espèces 1, 2 et 3. je1 : juvénile de l'espèce 1. Acquisition « naturelle » à partir de l'environnement (flèches bleues), Infection croisée « artificielle » en laboratoire (flèches noires).

Aussi le jeune asymbiotique ne possédant pas de bactériocytes *sensu stricto* mais uniquement des cellules indifférenciées serait capable de reconnaître et de s'associer à diverse souches de symbiotes. Néanmoins, au vu de l'analyse des symbiotes associés aux juvéniles, que j'ai réalisée, même si cette plasticité d'infection pourrait exister la sélection de la souche « préférentielle » pourrait également avoir lieu. A l'inverse, chez les adultes, la différenciation des cellules indifférenciées suite à la primo infection suivant la métamorphose pourrait aboutir à l'apparition de bactériocytes spécialisés. Ces derniers ne disparaissant pas en cas de purge, l'hôte ne serait capable de s'associer qu'avec cette souche particulière. Ainsi, dans cette association, la spécificité des couples hôtes/souches bactériennes existerait, mais une certaine plasticité des juvéniles permettrait une association plus labile qui pourrait se constituer avec une nouvelle souche en cas d'absence (ou de disparition) de la souche préférentiellement associée.

En conclusion, une diversité de souches au sein de l'espèce bactérienne (espèce C) associée aux Lucinidae des Antilles Françaises a été mise en évidence. De façon remarquable, une spécificité d'association entre espèces hôte et souches bactériennes a également été observée. Cette spécificité d'association serait due au contrôle intra-spécifique de la souche acquise par les hôtes. Cependant il semblerait qu'une certaine plasticité demeure chez les juvéniles leur permettant de s'associer, si nécessaire, à différentes souches de la bactérie. Ceci aurait pour conséquence une certaine labilité de l'association qui pourrait se faire et se défaire en fonction de la présence ou non de la souche bactérienne préférentiellement acquise par l'espèce hôte.

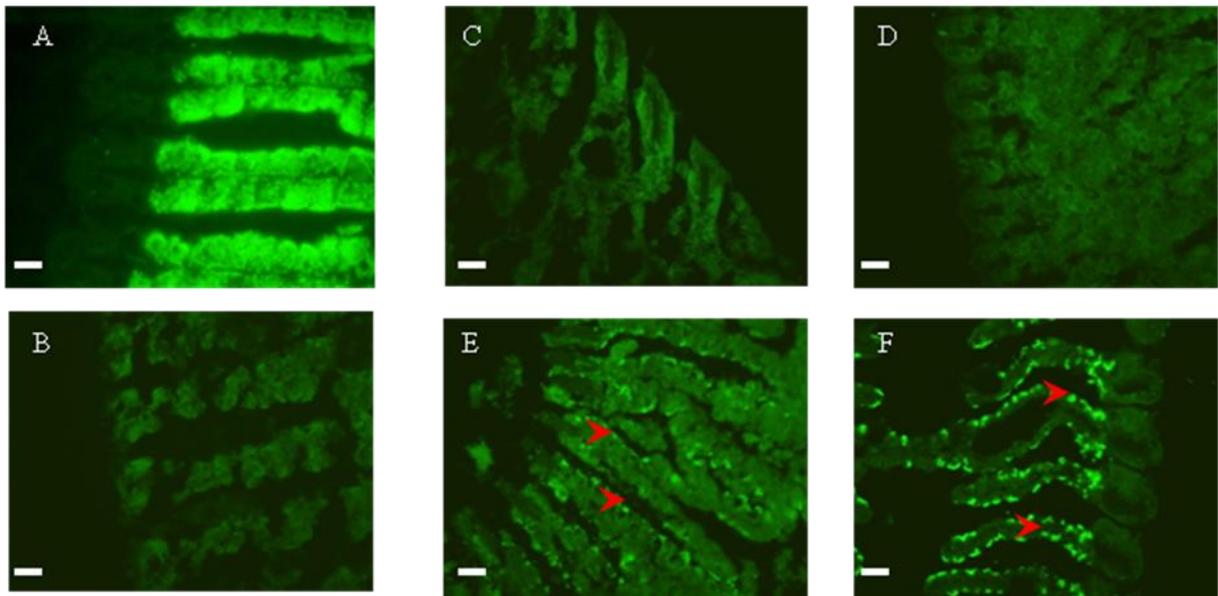


Figure 28. CARD-FISH réalisé à l'aide de la sonde Symco2A.

(A) Section d'une branchie de *C. orbiculata* fraîchement collecté (contrôle positif). (B) Section d'une branchie de *C. orbiculata* après 9 mois de jeûne (contrôle négatif). (C et D) Sections de branchies de *C. orbiculata* aposymbiotique après 4 jours (C) ou 8 jours (D) de contact avec une fraction purifiée de symbiotes provenant de *C. orbicularis*. (E et F) Sections de branchies de *C. orbiculata* aposymbiotique après 4 jours (E) ou 8 jours (F) de contact avec une fraction purifiée de symbiotes provenant de *C. orbiculata*. Echelles=10 μ m. Les flèches rouges représentent les symbiotes marqués.

DISCUSSION

GENERALE

DISCUSSION GENERALE

La symbiose est considérée comme un facteur essentiel dans l'évolution des espèces comme en témoigne par exemple les associations entre « invertébrés » marins et bactéries chimioautotrophes. Au cours de ce travail, j'ai étudié ce type d'associations à travers le modèle Lucinidae/bactéries sulfo-oxydantes. Ce modèle présente de nombreux avantages tels que la facilité d'échantillonnage et les manipulations *in vivo*. Je me suis donc intéressé au cours de ce travail de thèse à l'étude du mode de transmission du symbiote, de la nature réelle de la relation symbiotique, de la diversité bactérienne associée et enfin de la spécificité d'association entre les deux partenaires.

A l'origine l'association Lucinidae/bactéries thioautotrophes a été considérée à l'instar de toutes les associations chimioautotrophes comme étant de type mutualiste (Stewart *et al.*, 2005). En effet, l'hôte bénéficie de la bactérie qui d'une part détoxifierait son environnement (sulfides, méthane, etc.) et d'autre part supporte une grande partie de ses besoins nutritionnels (Arndt *et al.*, 2001). Ainsi l'hôte tire profit du métabolisme bactérien *via* les dérivés du cycle de Calvin-Benson (Cavanaugh *et al.*, 1992; Felbeck *et al.*, 1981) et dégrade la bactérie *via* la voie lysosomale (Liberge *et al.*, 2001). De l'autre côté, l'hôte conférerait à son symbiote un environnement protecteur et lui permettrait un meilleur accès aux ressources métaboliques (CO₂ et H₂S). En l'absence de transmission verticale chez les Lucinidae, la persistance de l'association à travers les générations, a été proposé *via* la transmission environnementale du symbiote (Gros *et al.*, 1996). En opposition à la règle généralement observée entre mode de transmission du symbiote et nature de l'association (*i.e.* transmission verticale pour les symbiotes mutualistes, transmission horizontale pour les parasites), le modèle Lucinidae/bactérie sulfo-oxydante constituerait, parmi d'autres, une exception avec une relation mutualiste sans transmission verticale du symbiote mais avec une transmission dite environnementale.

Cependant l'hypothèse du couple, mutualisme/transmission environnementale, pour le modèle Lucinidae ne me paraît pas être la plus pertinente. En effet, même si la forme libre du symbiote est présente dans l'environnement il n'y a pas multiplication des bactéries symbiotiques dans les bactériocytes de l'hôte (Caro *et al.*, 2007). J'ai pu montrer qu'il n'y

DISCUSSION GENERALE

aurait pas relarguage de la bactérie une fois celle-ci internalisée. Il semblerait donc qu'il n'y aurait pas transmission du symbiote à proprement parler chez les Lucinidae. Par conséquent, entrer en symbiose constituerait une impasse évolutive pour la bactérie, le succès reproducteur de la bactérie internalisée étant égal à zéro. Ces considérations ne supportent donc pas l'hypothèse mutualiste, le bénéfice de l'association (évalué au final par l'effet de l'association sur le succès reproducteur des deux partenaires) étant unilatéral au seul avantage de l'hôte Lucinidae. Cette association constituerait ainsi un cas tout à fait original de symbiose et s'inscrirait donc dans un cadre opposé à celui initialement proposé. A l'idée d'une association mutualiste à transmission environnementale se substituerait l'hypothèse d'une symbiose sans transmission du symbiote et apparemment non mutualiste.

Dans la littérature d'autres modèles symbiotiques considérés comme mutualistes mais sans transmission verticale du symbiote ont déjà été décrits. Tel est le cas de l'association entre Légumineuses et Rhizobia (bactéries des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, etc.). Dans cette association, la bactérie infectant la plante induit la formation de structures spécialisées, les nodules, où ont lieu les échanges hôte/symbiotes (Oldroyd and Downie, 2008; Soto *et al.*, 2009). Les bénéfices étant réciproques, l'association serait donc mutualiste. En effet le symbiote fixe l'azote atmosphérique et le transforme en ammonium qui est directement assimilable par la plante (Oldroyd and Downie, 2008). De l'autre côté, la plante fournit au symbiote des sucres et de l'énergie issus de la photosynthèse et nécessaires à son métabolisme (Bethlenfalvay *et al.*, 1978; Denison, 2000). Le symbiote peut de fait, dans ce modèle, se multiplier et dans certains cas être relargué dans l'environnement. Autre cas typique, l'association entre le céphalopode *Euprymna scolopes* et la bactérie *vibrio fischeri*. Dans cette association les jeunes sont également non symbiotiques et acquièrent leurs bactéries à partir de l'environnement (Ruby and Lee, 1998). La bactérie est localisée au niveau des tissus de l'hôte (organe bioluminescent) où elle se multiplie avant d'être relarguée. Par contre, le devenir des « bacterioides » (forme de la bactérie après différenciation dans les nodules dans le cas des légumineuses) ou des symbiotes du calmar après relarguage n'étant pas connu (*i.e* sont-ils perdus, se multiplient-ils dans l'environnement et/ou sont ils réacquis?) il est de difficile de conclure quant à la réelle transmission du symbiote. On peut dès lors également poser pour ces modèles l'hypothèse d'une absence de transmission du symbiote. Ceci pose donc comme pour les Lucinidae la question de la réelle nature de ces associations symbiotique.

NATURE DE LA RELATION

Dans ces modèles, même s'ils sont considérés comme mutualistes, certains mécanismes développés par les hôtes laissent à penser que la relation pourrait être unilatérale au seul bénéfice de ces derniers. En effet, chez les légumineuses, l'évolution prédit l'apparition de bactéries continuant à utiliser les produits de la photosynthèse mais fixant de moins en moins d'azote. Afin d'éviter ce parasitisme des réponses de la plante qui consistent à priver d'oxygène et d'énergie les nodules où les bactéries fixent le moins l'azote appelés « sanctions » ont été mises en évidence (Denarié *et al.*, 1976; Denison and Kiers, 2004). Ainsi seules les bactéries ayant un pouvoir de fixation de l'azote important peuvent se multiplier et être relarguées dans l'environnement. De fait, bien qu'engagée sur la voie du parasitisme, cette symbiose semble dès lors être maintenue au seul bénéfice de l'hôte. Le même patron d'unilatéralité est retrouvé chez le calmar. En effet, il semblerait que multiplication et relarguage du symbiote soient intrinsèquement liés à la relation qu'entretien le calmar avec la bactérie. Ce dernier tire profit des capacités bioluminescentes de son symbiote, celui-ci servant à la contre-illumination¹ (Jones and Nishiguchi, 2004). Or pour qu'il y ait production de lumière une densité seuil de bactéries doit être atteinte, engendrant par quorum-sensing l'activation de l'opéron *lux* (Callahan and Dunlap, 2000). Ainsi, les symbiotes acquis se multiplient dans la journée, et émettent de la lumière durant la nuit. La partie des symbiotes relargués par la suite permettant de diminuer la charge bactérienne afin de relancer le cycle. Il y a donc ici une nouvelle fois une relation qui semble être au seul bénéfice d'un des deux partenaires (hôte) bien que le symbiote puisse se multiplier et être relarguée. De fait, dans ces modèles où la relation semble unilatérale, l'hypothèse du mutualisme ne peut être proposée que si la valeur sélective des symbiotes relargués est différente de zéro.

Chez les Lucinidae, le symbiote est acquis à partir de l'environnement de façon continue sans multiplication dans les bactériocytes ni relarguage. Je considère que cette relation ne peut être qualifiée de mutualiste car comme dans les modèles précédents le bénéfice semble unilatéral (hôte) aux dépens de la bactérie. De plus chez ces bivalves le succès reproducteur des symbiotes est nul car entrer en symbiose constitue pour la bactérie

¹ Ce comportement est une technique de camouflage qui consiste à réduire sa silhouette en adoptant l'intensité et la longueur d'onde d'une autre source de lumière.

une impasse évolutive. Un tel profil s'apparente à du parasitisme. Peut-on dès lors qualifier les Lucinidae de parasites ?

UNE NOUVELLE VISION DE L'ASSOCIATION

LUCINIDAE/BACTERIES SULFO-OXYDANTES.

Selon nos résultats, la spécificité d'association observée serait due à une évolution antagoniste des deux partenaires. De plus, il semblerait que les juvéniles aient conservé une certaine plasticité d'association. Ces deux caractéristiques (*i.e.* co-évolution antagoniste et plasticité) sont couramment observées dans le cas des relations de type parasitaire. En effet, la course aux armements constitue un mécanisme central dans l'évolution des couples parasites/parasités. Le parasité évolue afin de faire tendre vers zéro le coût engendré par le parasite (ici par évitement de la reconnaissance *via* l'évolution des cibles correspondantes) alors que ce dernier tend à évoluer pour continuer à tirer bénéfice de l'association (ici par évolution des déterminants permettant la reconnaissance de la bactérie). De plus, certains parasites ont conservé (ou acquis) une plasticité d'infection leur permettant de « sauter » d'une espèce partenaire à une autre afin de pouvoir élargir leur « champ d'action ». Toutes ces observations supporteraient donc l'hypothèse du Lucinidae parasitant la bactérie sulfo-oxydante. Cependant, au sein des relations de type parasitaire l'association au parasité est quasi-obligatoire pour le parasite (Combes, 2003). Or, cette dernière caractéristique n'est pas observée chez les Lucinidae bien que la prévalence de l'association soit de 100% dans la nature. De fait, même si les Lucinidae semblent correspondre à des parasites, cette hypothèse ne peut être totalement validée.

D'autres types d'interactions vraisemblablement à bénéfice unilatéral ont également été décrits. Dans ces dernières l'hôte acquiert des capacités biochimiques en « s'associant » à d'autres organismes. Ces associations sont la plupart du temps limitées dans le temps et continuellement renouvelées. C'est l'exemple des dinoflagellés hétérotrophes *Gymnodinium acidotum* qui séquestrent l'algue cryptophyte *Chromonas spp.* et lui « volent » ses chloroplastes (qui demeurent fonctionnels) acquérant par la même une capacité photosynthétique (Fields and Rhodes, 1991). Les chloroplastes demeurent actifs quelques

temps puis sont dégradés par l'hôte et remplacés. Cette acquisition d'organelles à partir d'un autre organisme a été nommée kleptoplastie¹. Cette dernière est d'ailleurs supposée avoir été une étape intermédiaire clé dans la domestication des mitochondries par la cellule eucaryote (Cavalier-Smith, 1983).

Un tel phénomène a également été décrit chez le cilié *Myrionecta rubra* associé à une autre algue cryptophyte *Geminigera cryophila*. Dans ce cas, en plus de la kleptoplastie intervient la karyokleptie² (Johnson *et al.*, 2007). En effet, le noyau des algues est cette fois retenu et demeure transcriptionnellement actif, permettant ainsi au cilié de contrôler les fonctions essentielles (réplication, cytocinèse) des chloroplastes volés. De fait, l'utilisation de ces derniers peut être plus longue que dans les cas où intervient seulement la kleptoplastie.

Ces différentes stratégies permettent l'acquisition d'un potentiel biochimique inexistant à partir d'un autre organisme. Les Lucinidae qui sont hétérotrophes utilisent comme support majoritaire de leur biomasse les symbiotes sulfo-oxydants. Ceci leur confère une capacité chimioautotrophique qu'ils ne possèdent pas naturellement. Il s'agirait donc ici également de l'utilisation à des fins biochimiques (ici métaboliques) d'un organisme différent.

Ainsi, au vu de toutes ces observations que dire de l'association Lucinidae/bactéries sulfo-oxydantes initialement présentée comme mutualiste à transmission environnementale. Cette association constituerait donc une symbiose sans transmission du symbiote. Elle constituerait un cas original dans le monde des associations chimioautotrophes. L'hôte exploiterait son symbiote en profitant de ses capacités métaboliques. Le maintien d'une association stable de type parasitaire serait réalisé *via* un mécanisme de kleptoplastie. L'association serait donc durable avec renouvellement continu des symbiotes qui constitueraient des pseudo-organelles permettant à l'hôte hétérotrophe de devenir autotrophe.

Au sein des associations entre « invertébrés » marins et bactéries chimioautotrophes, certains modèles présentent de fortes similitudes avec celui des Lucinidae. En effet, l'acquisition du symbiote à partir de l'environnement a également été décrite chez les Mytilidae (Won *et al.*, 2003) ou les vestimentifères (Harmer *et al.*, 2008; Nussbaumer *et al.*,

¹ Du grec klépto (vol)

² Du grec karyon (noyau) et kleptie (vol)

DISCUSSION GENERALE

2006). De fait, ce modèle pourrait peut être s'appliquer à ces autres relations chimiosynthétiques.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Allen JA (1958). On the Basic Form and Adaptations to Habitat in the Lucinacea (Eulamellibranchia). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **241**: 421-484.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1919-25.
- Anderson CM, Haygood MG (2007). Alpha-proteobacterial symbionts of marine bryozoans in the genus *Watersipora*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 303-11.
- Ardell DH, Lozupone CA, Landweber LF (2003). Polymorphism, recombination and alternative unscrambling in the DNA polymerase alpha gene of the ciliate *Stylonychia lemnae* (Alveolata; class Spirotrichea). *Genetics* **165**: 1761-77.
- Arndt C, Gaill F, Felbeck H (2001). Anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. *J Exp Biol* **204**: 741-50.
- Ball AD, Purdy KJ, Glover EA, Taylor JD (2009). Ctenidial structure and three bacterial symbiont morphotypes in *Anodontia (Euanodontia) ovum* (REEVE, 1850) from the great barrier reef, AUSTRALIA (Bivalvia: Lucinidae). *J. Mollus. Stud. (in press.)*: eyp009.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**: 37-48.
- Bartoli P (1978). Modification de la croissance et du comportement de *Venerupis aurea* parasité par *Gymnophallus fossarum* (Trematoda). *Haliotis* **7**: 23-28.
- Berg CJJ, Alatalo P (1984). Potential of chemosynthesis in molluscan mariculture. *Aquaculture* **39**: 165-179.
- Beringer JE, Brewin N, Johnston AW, Schulman HM, Hopwood DA (1979). The Rhizobium-legume symbiosis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **204**: 219-33.
- Bernad A, Lázaro JM, Salas M, Blanco L (1990). The highly conserved amino acid sequence motif Tyr-Gly-Asp-Thr-Asp-Ser in alpha-like DNA polymerases is required by phage phi 29 DNA polymerase for protein-primed initiation and polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4610-4614.
- Bethlenfalvay GJ, Abu-Shakra SS, Phillips DA (1978). Interdependence of Nitrogen Nutrition and Photosynthesis in *Pisum sativum* L: II. Host Plant Response to Nitrogen Fixation by Rhizobium Strains. *Plant Physiol.* **62**: 131-133.

- Blaxter M (2007). Symbiont genes in host genomes: fragments with a future? *Cell Host Microbe* **2**: 211-3.
- Blazejak A, Kuever J, Erseus C, Amann R, Dubilier N (2006). Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (oligochaeta) from Bermuda and the Bahamas. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5527-36.
- Boettcher KJ, Ruby EG (1990). Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. *J Bacteriol* **172**: 3701-6.
- Boss KJ (1970). *Fimbria* and its lucinoid affinities (Mollusca; Bivalvia). *Breviora* **350**: 1-16.
- Buchner P (1965). *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscience: New York.
- Byun R, Elbourne LD, Lan R, Reeves PR (1999). Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. *Infect Immun* **67**: 1116-24.
- Callahan SM, Dunlap PV (2000). LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-lux genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology* **182**: 2811-2822.
- Caro A, Got P, Bouvy M, Troussellier M, Gros O (2009). Long term starvation of a host bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and effects on its symbiont population. *Appl Environ Microbiol*.
- Caro A, Gros O, Got P, De Wit R, Troussellier M (2007). Characterization of the population of the sulfur-oxidizing symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by single-cell analyses. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2101-9.
- Cary SC (1994). Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **3**: 121-30.
- Cary SC, Giovannoni SJ (1993). Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5695-9.
- Cary SC, Vetter RD, Felbeck H (1989). Habitat characterization and nutritional strategies of the endosymbiont-bearing bivalve *Lucinoma aequizonata*. *Mar Ecol Prog Ser* **55**: 31-45.
- Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, Lo N, Beninati T, Wernegreen JJ *et al* (2005). Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology* **151**: 4015-22.

- Castresana J (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-52.
- Cavalier-Smith T (1983). Endosymbiotic origin of the mitochondrial envelope. *In Endocytobiology II*. W. Schwemmler & H.E.A. Schendt: Berlin: de Gruyter. pp 265-279.
- 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.
- Chen SC, Liu HW, Lee KT, Yamakawa T (2007). High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of heat inducible sHSP18.2-GUS in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Rep* **26**: 29-37.
- Childress JJ, Fisher CR, Brooks JM, Kennicutt MC, 2nd, Bidigare R, Anderson AE (1986). A Methanophilic Marine Molluscan (*Bivalvia*, Mytilidae) Symbiosis: Mussels Fueled by Gas. *Science* **233**: 1306-1308.
- Cole RA, Lindsay DS, Blagburn BL, Sorjonen DC, Dubey JP (1995). Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Parasitol* **81**: 208-11.
- Colson P, Tamalet C, Raoult D (2006). SVARAP and aSVARAP: simple tools for quantitative analysis of nucleotide and amino acid variability and primer selection for clinical microbiology. *BMC Microbiol* **6**: 21.
- Combes C (2003). *L'art d'être parasite: Les associations du vivant*. Flammarion: Champs, N°545.
- Cooper JE, Feil EJ (2004). Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol* **12**: 373-7.
- Daims H, Bruhl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**: 434-44.
- Dalrymple BP, Kongsuwan K, Wijffels G, Dixon NE, Jennings PA (2001). A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11627-32.
- Dando PR, Southward AJ, Southward EC, Terwilliger NB, Terwilliger RC (1985). Sulfur-oxidizing bacteria and hemoglobin in gills of the bivalve mollusk *Myrtea spinifera*. *Marine Ecology-Progress Series* **23**: 85-98.
- Dawkins R (1982). *The extended phenotype*. Oxford University Press: Oxford, England.
- Delmotte F, Rispe C, Schaber J, Silva FJ, Moya A (2006). Tempo and mode of early gene loss in endosymbiotic bacteria from insects. *BMC Evol Biol* **6**: 56.

- Deming JW, Reysenbach AL, Macko SA, Smith CR (1997). Evidence for the microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor: bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. *Microsc Res Tech* **37**: 162-70.
- Denarié J, Truchet G, Bergeron B (1976). Effects of some mutations on symbiotic properties of *Rhizobium*. In: PS. N (ed). *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge University Press: Cambridge. pp 47-63.
- Denison RF (2000). Legume Sanctions and the Evolution of Symbiotic Cooperation by Rhizobia. *The American Naturalist* **156**: 567-576.
- Denison RF, Kiers ET (2004). Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic? *Microbes and Infection* **6**: 1235-1239.
- Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, McCracken VJ, Aminov R, Mackie RI *et al* (2000). Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2166-74.
- Di Meo CA, Wilbur AE, Holben WE, Feldman RA, Vrijenhoek RC, Cary SC (2000). Genetic variation among endosymbionts of widely distributed vestimentiferan tubeworms. *Appl Environ Microbiol* **66**: 651-8.
- Distel DL, Felbeck H (1988). Pathways of inorganic carbon fixation in the endosymbiont-bearing lucinid clam *Lucinoma aequizonata*. Part 1. Purification and characterization of the endosymbiotic bacteria. *J Exp Zool* **247**: 1-10.
- Distel DL, Felbeck H, Cavanaugh CM (1994). Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbiont and their Bivalve hosts. *J Mol Evol* **38**: 533-542.
- 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**: 2506-10.
- Dubilier N, Bergin C, Lott C (2008). Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* **6**: 725-40.
- Dubilier N, Giere O, Distel DL, Cavanaugh CM (1995). Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (Oligochaeta: Annelida) by phylogenetic 16S rRNA sequence analysis and in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2346-50.
- Dubinsky Z, Stambler N, Benzion M, McCloskey LR, Muscatine L, Falkowski PG (1990). The Effect of External Nutrient Resources on the Optical-Properties and Photosynthetic Efficiency of Stylophora-Pistillata. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **239**: 231-&.

- Duperron S, Fiala-Medioni A, Caprais JC, Olu K, Sibuet M (2007). Evidence for chemoautotrophic symbiosis in a Mediterranean cold seep clam (Bivalvia: Lucinidae): comparative sequence analysis of bacterial 16S rRNA, APS reductase and RubisCO genes. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 64-70.
- 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**: 433-45.
- Duperron S, Laurent MC, Gaill F, Gros O (2008b). Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of Mytilidae associated with wood falls. *FEMS Microbiol Ecol* **63**: 338-49.
- 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**: 1694-700.
- Durand P, Gros O (1996). Bacterial host specificity of Lucinacea endosymbionts: interspecific variation in 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **140**: 193-8.
- Durand P, Gros O, Frenkiel L, Prieur D (1996). Phylogenetic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three tropical Lucinidae by 16S rDNA sequence analysis. *Mol Mar Biol Biotechnol* **5**: 37-42.
- Ewald PW (1987). Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Ann N Y Acad Sci* **503**: 295-306.
- Felbeck H, Childress JJ, Somero GN (1981). Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* **293**: 291-3.
- Feldman RA, Black MB, Cary CS, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1997). Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. *Mol Mar Biol Biotechnol* **6**: 268-77.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Fields SD, Rhodes RG (1991). Ingestion and retention of *Chroomonas* spp. (Cryptophyceae) by *Gymnodinium acidotum* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* **27**: 525-529.
- Fisher CR (1990). Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Reviews in Aquatic Sciences* **2**: 399-436.
- Fisher CR, Brooks JM, Vodenichar JS, Zande JM, Childress JJ, Burke RA (1993). The cooccurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *Marine Ecology-Pubblicazioni Della Stazione Zoologica Di Napoli I* **14**: 277-289.

BIBLIOGRAPHIE

- Frenkiel L, Gros O, Mouëza M (1996). Gill structure in *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae) with reference to hemoglobin in bivalves with symbiotic sulphur-oxidizing bacteria. *Mar Biol* **125**: 511-524.
- Frenkiel L, Mouëza M (1995). Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Zoomorphology* **115**: 51-61.
- Gavira JA, Camara-Artigas A, De Jesus-Bonilla W, Lopez-Garriga J, Lewis A, Pietri R *et al* (2008). Structure and ligand selection of hemoglobin II from *Lucina pectinata*. *J Biol Chem* **283**: 9414-23.
- Gil R, Latorre A, Moya A (2004). Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environ Microbiol* **6**: 1109-22.
- Giorgini M, Monti MM, Caprio E, Stouthamer R, Hunter MS (2009). Feminization and the collapse of haplodiploidy in an asexual parasitoid wasp harboring the bacterial symbiont *Cardinium*. *Heredity* **102**: 365-71.
- Gomez-Valero L, Silva FJ, Christophe Simon J, Latorre A (2007). Genome reduction of the aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola* in a recent evolutionary time scale. *Gene* **389**: 87-95.
- Gotoh T, Noda H, Ito S (2007). *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity* **98**: 13-20.
- Groot TV, Breeuwer JA (2006). *Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Exp Appl Acarol* **39**: 257-71.
- Gros O, Darrasse A, Durand P, Frenkiel L, Mouëza M (1996). Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2324-30.
- Gros O, De Wulf-Durand P, Frenkiel L, Mouëza M (1998a). Putative environmental transmission of sulfur-oxidizing bacterial symbionts in tropical lucinid bivalves inhabiting various environments. *FEMS Microbiol Lett* **160**: 257-262.
- Gros O, Duplessis MR, Felbeck H (1999). Embryonic Development and endosymbiont transmission mode in the symbiotic clam *Lucinoma aequizonata* (Bivalvia: Lucinidae). *Invert Reprod Dev* **36**: 93-103.
- Gros O, Frenkiel L, Felbeck H (2000). Sulfur-oxidizing endosymbiosis in *Divaricella quadrisulcata* (Bivalvia: Lucinidae): Morphological, ultrastructural, and phylogenetic analysis. *Symbiosis* **29**: 293-317.
- Gros O, Frenkiel L, Mouëza M (1997). Embryonic, larval, and post-larval development in the symbiotic clam *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology* **116**: 86-101.

- Gros O, Frenkiel L, Moueza M (1998b). 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, Gaill F (2007). Extracellular bacterial association in gills of "wood mussels". *Cah Biol Mar* **48**: 103-109.
- Gros O, Guibert J, Gaill F (2007). Gill-symbiosis in mytilidae associated with wood fall environments. *Zoomorphology* **126**: 163-172.
- Gros O, Liberge M, Felbeck H (2003a). Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Mar Biol* **142**: 57-66.
- Gros O, Liberge M, Heddi A, Khatchadourian C, Felbeck H (2003b). Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (*Thalassia testudinum* environment). *Appl Environ Microbiol* **69**: 6264-7.
- Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704.
- 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**: 3895-8.
- Hoffmann AA, Turelli M, Simmons GM (1986). Unidirectional Incompatibility between Populations of *Drosophila simulans*. *Evolution* **40**: 692-701.
- Holmes DE, Nevin KP, Lovley DR (2004). Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB and fusA genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1591-9.
- Hurst GD, Jiggins FM (2000). Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerg Infect Dis* **6**: 329-36.
- Ishaq M, Wolf B, Ritter C (1990). Large-scale isolation of plasmid DNA using cetyltrimethylammonium bromide. *Biotechniques* **9**: 19-20, 22, 24.
- Johnson MD, Oldach D, Delwiche CF, Stoecker DK (2007). Retention of transcriptionally active cryptophyte nuclei by the ciliate *Myrionecta rubra*. *Nature* **445**: 426-8.
- Jones BW, Nishiguchi MK (2004). Counterillumination in the hawaiian bobtail squid, *Euprymna scolopes* Berry (Mollusca : Cephalopoda). *Marine Biology* **144**: 1151-1155.
- Jorgensen BB (1982). Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **298**: 543-61.

BIBLIOGRAPHIE

- Juniper SK, Sibuet M (1987). Cold seep benthic communities in Japan subduction zones - Spatial organisation - Trophic strategies and evidence for temporal evolution. *Marine Ecology-Progress Series* **40**: 115-126.
- Karlin S, Brocchieri L (1996). Evolutionary conservation of RecA genes in relation to protein structure and function. *J Bacteriol* **178**: 1881-94.
- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McLnerney JO (2006). Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* **6**: 29.
- Kim DR, Pritchard AE, McHenry CS (1997). Localization of the active site of the alpha subunit of the Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme. *J Bacteriol* **179**: 6721-8.
- Kraus DW. (1993). *Symposium on Life with Sulfide, at the Annual Meeting of the American-Society-of-Zoologists*. Amer Soc Zoologists: Los Angeles, Ca, pp 112-120.
- Kraus DW, Wittenberg JB (1990). Hemoglobins of the *Lucina pectinata*/bacteria symbiosis. I. Molecular properties, kinetics and equilibria of reactions with ligands. *J Biol Chem* **265**: 16043-53.
- Krueger DM, Gustafson RG, Cavanaugh CM (1996). Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *Biol Bull* **190**: 195-202.
- Lane DJ (1991). 16S/23S Sequencing. In: Stackebrandt E GM (ed). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons.: New York. pp 115-175.
- Le Pennec M, Diouris M, Herry M (1988). Endocytosis and lysis of bacteria in gill epithelium of *Bathymodiolus thermophilus*, *Thyasira flexuosa*, and *Lucinella divaricata*. (Bivalvia:Mollusca). *J Shellfish Res* **7**: 483-489.
- Liberge M, Gros O, Frenkiel L (2001). Lysosomes and sulfide-oxidizing bodies in the bacteriocytes of *Lucina pectinata*, a cytochemical and microanalysis approach. *Mar Biol* **139**: 401-409.
- Margulis L, Fester R (1991). Bellagio conference and book. Symbiosis as Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis. Conference--June 25-30, 1989, Bellagio Conference Center, Italy. *Symbiosis* **11**: 93-101.
- McCann J, Stabb EV, Millikan DS, Ruby EG (2003). Population dynamics of *Vibrio fischeri* during infection of *Euprymna scolopes*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5928-34.
- McCutcheon JP, McDonald BR, Moran NA (2009). Origin of an alternative genetic code in the extremely small and GC-rich genome of a bacterial symbiont. *PLoS Genet* **5**: e1000565.

- Meyer B, Kuever J (2007). Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes--origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**: 2026-44.
- Milne I, Wright F, Rowe G, Marshall DF, Husmeier D, McGuire G (2004). TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* **20**: 1806-7.
- Musat N, Giere O, Gieseke A, Thiermann F, Amann R, Dubilier N (2007). Molecular and morphological characterization of the association between bacterial endosymbionts and the marine nematode *Astomonema sp.* from the Bahamas. *Environ Microbiol* **9**: 1345-53.
- Newell ND (1969). Classification of Bivalvia. *In: Treatise on invertebrates paleontology.* . The Geological Society of America and the University of Kansas. pp N205-N224.
- Nikoh N, Nakabachi A (2009). Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer. *BMC Biol* **7**: 12.
- Nussbaumer AD, Fisher CR, Bright M (2006). Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* **441**: 345-8.
- Oldroyd GED, Downie JA (2008). Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 519-546.
- Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA, Littlewood DT (2003). Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int J Parasitol* **33**: 733-55.
- Ott J, Bright M, Bulgheresi S (2004). Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria. *Symbiosis* **36**: 103-126.
- Peek AS, Feldman RA, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1998a). Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9962-6.
- Peek AS, Vrijenhoek RC, Gaut BS (1998b). Accelerated evolutionary rate in sulfur-oxidizing endosymbiotic bacteria associated with the mode of symbiont transmission. *Mol Biol Evol* **15**: 1514-23.
- Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2002). Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3094-101.
- Piednoel M, Bonnivard E (2009). DIRS1-like retrotransposons are widely distributed among Decapoda and are particularly present in hydrothermal vent organisms. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 86.

BIBLIOGRAPHIE

- Polz MF, Cavanaugh CM (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7232-6.
- Reid RGB, Brand DG (1986). Sulfide-Oxidizing Symbiosis in Lucinaceans - Implications for Bivalve Evolution. *Veliger* **29**: 3-24.
- Rigaud T, Moreau J, Juchault P (1999). Wolbachia infection in the terrestrial isopod oniscus asellus: sex ratio distortion and effect on fecundity. *Heredity* **83**: 469-75.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-4.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496-7.
- Rozen S, Skaletsky H (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-86.
- Ruby EG, Lee KH (1998). The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* Light Organ Association: Current Ecological Paradigms. *Appl Environ Microbiol* **64**: 805-812.
- Sachs JL, Mueller UG, Wilcox TP, Bull JJ (2004). The evolution of cooperation. *Quarterly Review of Biology* **79**: 135-160.
- Schwarz G (1978). Estimating the Dimension of a Model. *Ann. Statist.* **6**: 461-464.
- Schweimanns M, Felbeck H (1985). Significance of the occurrence of chemoautotrophic bacterial endosymbionts in lucinid clams from Bermuda. *Mar Ecol Prog Ser* **24**: 113-120.
- Shimodaira H (2002). An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst Biol* **51**: 492-508.
- Soto JM, Domínguez-Ferreras A, Pérez-Mendoza D, Sanjuán J, Olivares J (2009). Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular Microbiology* **11**: 381-388.
- Spiridonova EM, Kuznetsov BB, Pimenov NV, Turova TP (2006). [Phylogenetic characterization of endosymbionts of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* by analysis of the 16S rRNA, *pmoL*, and *cbbA* genes]. *Mikrobiologiya* **75**: 798-806.
- Stewart FJ, Newton IL, Cavanaugh CM (2005). Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic-anoxic interfaces. *Trends Microbiol* **13**: 439-48.
- Stouthamer R, Breeuwer JA, Luck RF, Werren JH (1993). Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* **361**: 66-8.

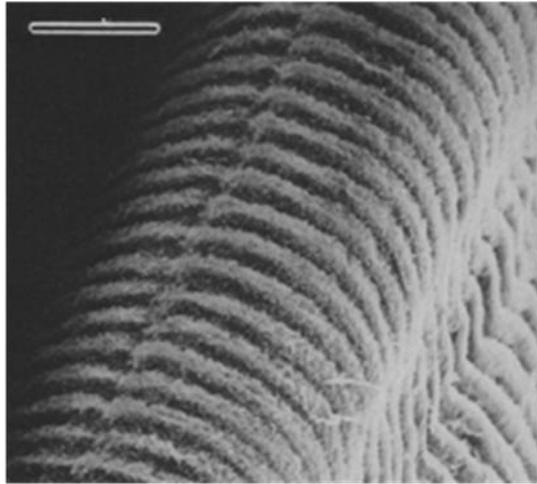
- Tan ZJ, Xie BY, Xiao QM, Yang YH, Wan FH, Huang SW (2005). Association of different endosymbionts with the whitefly species *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Sternorrhyncha : Aleyrodidae). *Entomologia Generalis* **28**: 173-182.
- Taylor JD, Glover EA (2005). Lucinidae (Bivalvia) – the most diverse group of chemosymbiotic molluscs. *Zool J Linnean Society* **148**.
- Taylor JD, Williams ST, Glover EA, Dyal P (2007). A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca : Bivalvia : Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes. *Zoologica Scripta* **36**: 587-606.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-80.
- Van Valen L (1973). A new evolutionary law. *Evol. Theory* **1**: 1-30.
- Vrijenhoek RC, Duhaimé M, Jones WJ (2007). Subtype variation among bacterial endosymbionts of tubeworms (Annelida: Siboglinidae) from the Gulf of California. *Biol Bull* **212**: 180-4.
- Williams ST, Taylor JD, Glover EA (2003). Molecular Phylogeny of the Lucinoidea (Bivalvia): Non-Monophyly and Separate Acquisition of Bacterial Chemosymbiosis. *J Molluscan Stud* **70**: 187-202.
- Winnepenninckx BM, Reid DG, Backeljau T (1998). Performance of 18S rRNA in littorinid phylogeny (Gastropoda: Caenogastropoda). *J Mol Evol* **47**: 586-96.
- Won YJ, Hallam SJ, O'Mullan GD, Pan IL, Buck KR, Vrijenhoek RC (2003). Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *bathymodiolus*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6785-92.
- Woolfit M, Bromham L (2003). Increased rates of sequence evolution in endosymbiotic bacteria and fungi with small effective population sizes. *Mol Biol Evol* **20**: 1545-55.
- Woyke T, Teeling H, Ivanova NN, Huntemann M, Richter M, Gloeckner FO *et al* (2006). Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* **443**: 950-5.
- Yu XJ, Walker DH, Liu Y, Zhang L (2009). Amino acid biosynthesis deficiency in bacteria associated with human and animal hosts. *Infect Genet Evol* **9**: 514-7.
- 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, 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.

BIBLIOGRAPHIE

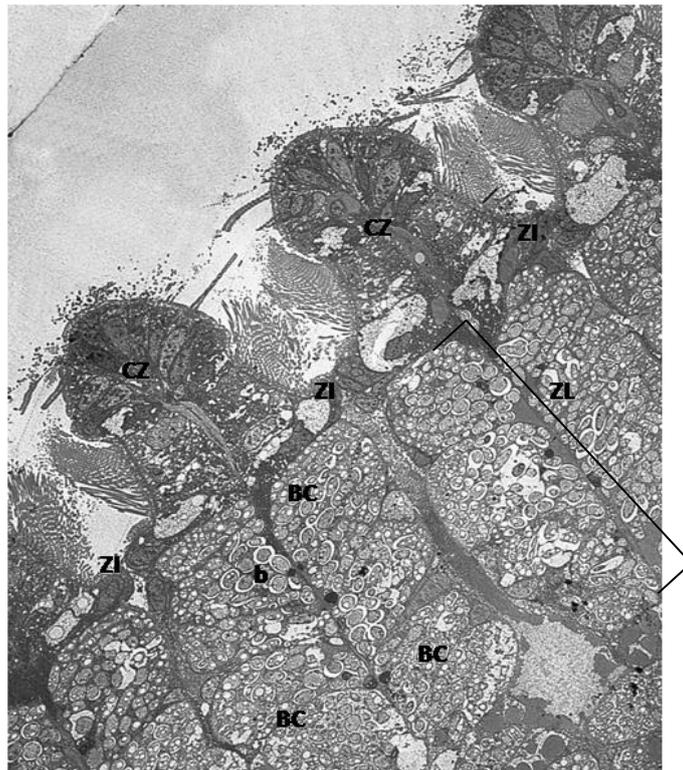
- Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, de Montlaur CD, Roussel E, Guyot F *et al* (2008). New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **359**: 131-140.
- Zhang DX, Hewitt GM (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* **12**: 563-84.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316-22.
- Zimmer RL, Woollacott RM (1983). Mycoplasma-Like Organisms: Occurrence with the Larvae and Adults of a Marine Bryozoan. *Science* **220**: 208-210.

ANNEXES

ANNEXE 1 : STRUCTURE DES BRANCHIES DE LUCINIDAE



Vue générale d'une branchie de *Lucina pectinata* en MEB. Echelle 100µm.



Section frontale d'une branchie. Zone latérale (ZC), Zone intermédiaire (ZI), Zonze latérale (ZL), Bactériocyte (BC), bactéries (b). (Photo O. Gros)

**ANNEXE 2 : LISTE DES BACTERIES UTILISEES DANS LE CADRE DE LA
RECHERCHE DE MARQUEURS.**

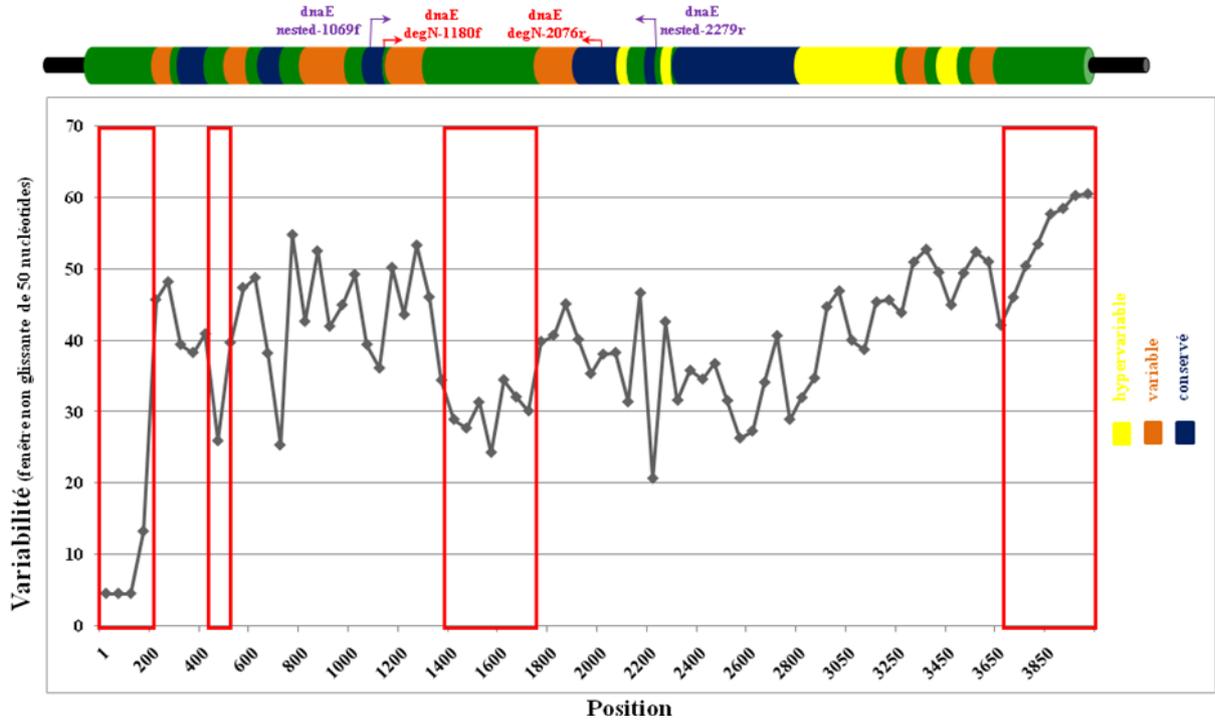
ETUDE DE LA VARIABILITÉ.

ESPECE (SOUCHE) BACTERIENNE	TaxID (Genbank)
<i>Escherichia coli</i> K12	83333
<i>Haemophilus influenzae</i> rd KW20	71421
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC2396	349521
<i>Legionella pneumophila</i> str. Paris	297246
<i>Nitrosococcus oceani</i> ATCC19707	323261
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	203122
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	99287
<i>Shigella boydii</i> Sb227	300268
<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	216895
<i>Yersinia pestis</i> CO92	214092
<i>Escherichia coli</i> 536	362663
<i>Escherichia coli</i> APEC01	405955
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	481805
<i>Escherichia coli</i> CFT073	199310
<i>Escherichia coli</i> IAI39	585057
<i>Escherichia coli</i> K12	83333
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	83334
<i>Escherichia coli</i> s88	585035
<i>Escherichia coli</i> UMN026	585056
<i>Escherichia coli</i> UTI89	364106
<i>Legionella pneumophila</i> str. Paris	297246
<i>Legionella pneumophila</i> str. Lens	297245
<i>Legionella pneumophila</i> str. Corby	400673
<i>Legionella pneumophila</i> str. Philadelphia 1	272624

RECHERCHE DE TRANSFERTS HORIZONTAUX

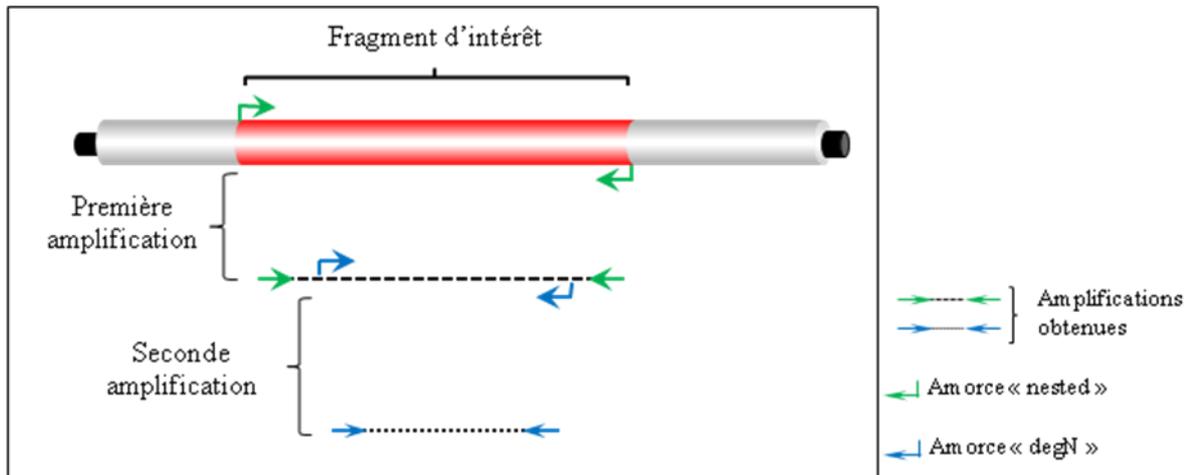
ESPECE BACTERIENNE	TAXON	TaxID (Genbank)
<i>Escherichia coli</i> K12		83333
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC2396		349521
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	γ -protéobactéria	99287
<i>Shigella boydii</i> Sb227		300268
<i>Yersinia pestis</i> CO92		214092
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I		257313
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b		320372
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	β -protéobactéria	122587
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718		228410
<i>Nitrospira multiformis</i> ATCC 25196		323848
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168		224308
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363		416870
<i>Listeria monocytogenes</i> str. 4b F2365	Bacilli	265669
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50		158878
<i>Streptococcus agalactiae</i> NEM316		211110
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58		176299
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	α -proteobacteria	342108
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42		347834
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009		258594
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37rv	Actinobacteria	83332
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)		100226
<i>Chlamydia trachomatis</i> A/HAR-13	Chlamydia	315277
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CWL029		115713
<i>Borrelia burgdoferi</i> B31	Spirochaetes	224326
<i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>lai</i> str. 56601		189518
<i>Anabaena varabilis</i> ATCC29413	Cyannobacteria	240292
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC6301		269084

ANNEXE 3: PROFIL « SVARAP » DU GENE DNAE.

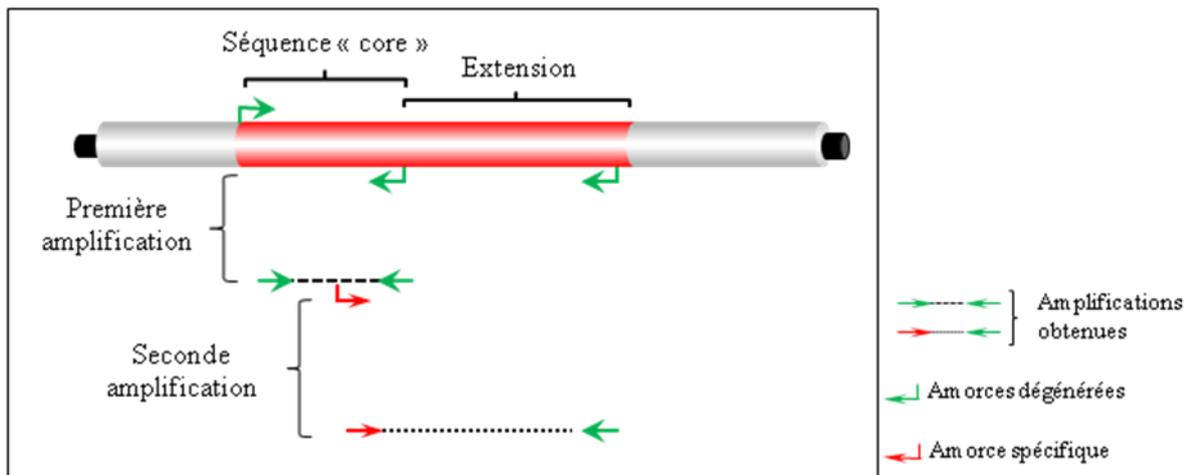


ANNEXE 4 : TECHNIQUES PARTICULIERES UTILISEES.

PCR EMBOITEE



« TE-WALKING »



ARTICLES

ARTICLE 1 : BRISSAC ET AL. (2009)

FEMS Microbiol. Ecol. 67:261-267

ARTICLE 2 : BRISSAC ET AL.

Soumis à *Environmental Microbiology*

Unexpected structured intraspecific symbiotic diversity within Lucinidae (Mollusca: Bivalvia).

Terry Brissac^{1,2,*}, Dominique Higué¹, Olivier Gros² and Hervé Merçot¹

¹UMR 7138 UPMC-CNRS-MNHN-IRD « Systématique, Adaptation, Évolution », Equipe: « Génétique & Evolution », Université Pierre et Marie Curie, Bat. A, 4^{ème} étage, 7 quai S^t Bernard, 75005 Paris, France.

² UMR 7138 UPMC-CNRS-MNHN-IRD « Systématique, Adaptation, Évolution », Equipe: « Symbiose », Département de Biologie, Université des Antilles et de la Guyane B.P. 592, 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe (France).

Correspondence: UMR 7138 CNRS-IRD-UPMC-MNHN « Systématique, Adaptation, Evolution », Equipe « Génétique & Evolution », Université Pierre et Marie Curie, Bat. A, 4^{ème} étage, 7 quai S^t Bernard, 75005 Paris, France. E-mail: terry.brissac@snv.jussieu.fr.

Running Head: Bacterial strain diversity within Lucinidae.

Abstract

In chemoautotrophic associations, 16S rRNA usual marker was often used to characterize symbionts diversity. Within Lucinidae, this symbiotic diversity seems no species-specific since exactly the same sulfur-oxidizing bacterial species was described harbored by six host species belonging to four different genus from Lesser Antilles. Nevertheless, according to the low evolution rate of this marker, a strain diversity linked to geography, ecosystems or hosts diversity could occur as described within Mytilidae or vestimentiferan tubeworms. In order to highlight a potential diversity of symbionts associated with this six host species, we developed a MLST (Multi-Locus Sequence Typing) analysis using five different markers. According to our survey, a symbiont strain diversity of near 1.5% within Lucinidae is obvious. Bacterial haplotype networks realized with sequences reveal whatever the marker the same haplotype pattern. At local level (same biotope in same geographic location), this observed diversity appears to be structured in function of host diversity. Moreover, in-situ hybridizations realized on cross-infected individuals attest of this specificity of association. Despite the fact that the method used here (PCR product direct sequencing) could underestimate diversity, for a same bacterial species we observe specific associations between hosts and bacterial strains which could be due at local level to a Red-Queen type antagonist evolution.

Keywords: *Codakia* / MLST / Haplotype networks / Red-Queen evolution.

Introduction

From ecology to morphology and enzymology, many studies have permitted a better understanding of associations between marine invertebrates and chemoautotrophic bacteria (Dubilier *et al.*, 2008; Felbeck *et al.*, 1981; Fisher, 1990; Stewart *et al.*, 2005). In these associations, the characterization of symbionts was realized using 16S rRNA sequences (Blazejak *et al.*, 2006; Cary *et al.*, 1993; Dubilier *et al.*, 1995; Duperron *et al.*, 2008b; Durand *et al.*, 1996; Polz and Cavanaugh, 1995; Polz *et al.*, 1994). According to this maker, the majority of symbionts involved in these interactions belong to the gamma-proteobacteria subdivision even if alpha-, delta-, epsilon-proteobacteria and spirochaetes are also retrieved (Dubilier *et al.*, 2008). These associations have been described in single or multi-infections (DeChaine and Cavanaugh, 2006; Duperron *et al.*, 2008a; Woyke *et al.*, 2006). 16S rRNA sequences have also been used to study symbiont diversity compared to host diversity (Distel *et al.*, 1994; Distel *et al.*, 1988; Feldman *et al.*, 1997; Peek *et al.*, 1998).

Commonly, species-specific associations are maintained by vertical transmission of the symbiont (Peek *et al.*, 1998). In fact, in cases where symbionts are vertically transmitted (from parents to offspring *via* gametes), congruent evolutionary histories of hosts and symbionts, due to co-evolution of the two partners, lead to the specific couples observed today, like those described for example within the bivalve family of Vesicomidae (Peek *et al.*, 1998). However, in cases where symbionts are not vertically acquired, symbiont diversity does not seem related to host diversity. For example, within vestimentiferan tubeworms or lucinid bivalves no species-specific association is apparent since different host species can be associated to the same symbiont species (Durand and Gros, 1996; Durand *et al.*, 1996; Feldman *et al.*, 1997; Gros *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2003a). In these cases the association seems to depend on the free-living symbiont form of the bacterial species present in the environment. Thus, host species inhabiting the same environments harbor the same (or close) symbiont species. In the latter situation, 16S rRNA could be insufficient to highlight eventual diversity (Di Meo *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 1992; Tanabe *et al.*, 2007; Woese, 1987). Thus in *Thalassia testudinum* sea-grass beds of the Lesser Antilles, where six lucinid host species harbor the same bacterial species (Durand and Gros, 1996; Durand *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2003a), this bacterial species may present a strain diversity related to host species (phylogroup), geographic location or ecological factors (ecotype), as described for example in vestimentiferan tubeworms (Di Meo *et al.*, 2000) or Mytilidae (DeChaine and Cavanaugh, 2006; Won *et al.*, 2003). Accordingly, as in the latter case, further analyses must be used to study the genetic variation of endosymbionts and the specificity of host/symbiont couples within the Lucinidae/sulfur-oxidizing endosymbionts model.

To date, all lucinid genera analyzed harbor endosymbiotic thioautotrophic gamma-proteobacteria localized in specialized cells of the gills called bacteriocytes (Fisher, 1990). Bacterial colonization occurs at the juvenile stage after metamorphosis as previously described in the tropical shallow-water species *Codakia orbicularis* (Gros *et al.*, 1996), in the deep-water species *Lucinoma aequizonata* (Gros *et al.*, 1999) and suggested for other Caribbean lucinids (Gros *et al.*, 1998); symbionts being acquired from a free-living stock of symbiosis-competent bacteria present in the environment (Gros *et al.*, 2003b). In this paper, we aim to analyze genetic intraspecific diversity within the symbiotic species shared by the six lucinid host species inhabiting sea-grass beds of Guadeloupe and Martinique (Lesser Antilles). We developed a Multi-Locus Sequence Typing (MLST) approach using five different markers to measure strain diversity between gill-endosymbionts from different lucinid hosts and to determine whether this diversity is structured in function of hosts, geographic location or environmental factors.

Results

Symbionts 16S rRNA sequences analysis

All PCR amplifications realized from gills of *Anodontia alba*, *Codakia orbicularis*, *Codakia orbiculata*, *Codakia pectinella*, *Divaricella quadrisulcata* and *Linga pensylvanica* gave a unique 16S rRNA bacterial sequence per host without any ambiguity according to ABI chromatograph analysis. These sequences present 99.6% mean sequence identity (1466 bp).

Host phylogeny

For all amplifications of 18S rRNA and 28S rRNA genes, a unique band of the expected size (~1000bp and ~700bp respectively) was observed. We analyzed the six host species named above and chose as outgroup for phylogenetic analyses, Thyasiridae and Crassatellidae, which are sister-groups of Lucinidae (Williams *et al.*, 2003). According to this phylogeny (Fig. 1) the six host lucinids fall in the different clades described by Williams *et al.* (Williams *et al.*, 2003): *Anodontia* clade for *A. alba*, clade A for *C. orbicularis* and *C. orbiculata* and Clade B for *C. pectinella*, *D. quadrisulcata* and *L. pensylvanica*. Concerning *A. alba* and *C. orbicularis*, sequences obtained here correspond to those published by Williams *et al.* (Williams *et al.*, 2003).

Symbiont polymorphism analysis

Polymorphism results are presented in Table 1 and show that about 1.5% of sites are polymorphic. *ITS1* constitutes the most variable marker (2.14%), *aprA* and *cbbL* metabolism genes are more variable than *dnaE* and *gyrB* housekeeping genes (1.62%, 1.83%, 1.29% and 0.74% respectively). According to haplotype networks (Fig. 2), realized using sequences of five markers on 18 individuals (three per host species), we observe different haplotypes (up to five or six according to the marker) showing an intra-specific bacterial diversity. Interestingly, except for *ITS1*, the major haplotype seems not to be an ancestral haplotype from which others are derived. Considering host species, the different haplotypes are not randomly distributed among the 18 individuals analyzed. Thus, the observed diversity seems structured. For *C. orbicularis* the three individuals present whatever the marker the same particular haplotype. This pattern is also retrieved for individuals of *L. Pensylvanica*. For *C. orbiculata*, *C. pectinella* the same haplotype is shared by the different individuals belonging to these host species (Fig. 2). In addition, we also sequenced *dnaE*, *gyrB*, and *aprA* for three *C. orbicularis* sub-adults (0.5 cm shell-length). According to these sequences, sub-adults harbor exactly the same symbiont as adults (100% of sequence identity for each marker). Moreover, the layer of sediment comprised between 0 and 5 cm was also analyzed using *dnaE* marker. After sequencing of five clones we observed one clone which corresponds to *C. orbicularis* symbiont (one mismatch for 465 bp). The four other clones seem to correspond to bacterial sequences different from those harbored by host species inhabiting sea-grass beds of Îlet Cochon (mean sequence divergence of 83% compared to *C. orbicularis* symbiont). Finally, *dnaE* sequences for one *C. orbicularis* individual and one *C. orbiculata* individual from Martinique were also realized. These two host species harbor bacterial sequences which are different from those retrieved in the same host species in Guadeloupe (respectively two and four mismatches in relation to Guadeloupe symbionts).

Cross-Infections

Slides from cross-infections were hybridized with symco2A probe (16S rRNA probe specific of Lucinidae symbionts from Lesser Antilles (Gros *et al.*, 2003b)). A positive hybridization in the lateral zone where symbionts are distributed is observed throughout gill sections of freshly collected *C. orbiculata* used as positive control (Fig. 3A). Gill sections from *C. orbiculata* individuals kept in starvation in the laboratory during 9 months presented no hybridization signal (Fig. 3B) suggesting that such starved individuals are devoid of endosymbionts (OG, personal communication). Such starved individuals put in contact with *C. orbicularis* bacterial gill-endosymbionts purified fraction did not present any bacterial endosymbiont positively detected by CARD-FISH after 4 days (Fig. 3C) or 8 days (Fig. 3D) suggesting the lack of infection by symbiosis-competent bacteria. On the other hand, when *C. orbiculata* starved individuals were put in contact with gill-endosymbiont purified fraction from *C. orbiculata* individuals freshly collected from the field, we observed the first step of bacterial colonization after 4 days (Fig. 3E), a more developed infection after 8 days (Fig. 3F) up to a complete colonization after 15 days (data not shown).

Discussion

The purpose of this study was to analyze the genetic diversity of sulfur-oxidizing endosymbionts associated with six bivalve species of the Lucinidae family (*A. alba*, *C. orbicularis*, *C. orbiculata*, *C. pectinella*, *D. quadrisulcata* and *L. pensylvanica*) inhabiting *T. testudinum* sea-grass beds in Lesser Antilles. We sequenced 16S rRNA in symbionts of these six host species (three individuals per host species). We found that these six species harbor the same bacterial species as previously described (Durand and Gros, 1996; Durand *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2003a). Considering that 16S rRNA is not discriminant enough to describe diversity at intra-specific level, we used a MLST approach to detect a possible strain diversity within these endosymbionts, which may be structured as a function of host diversity, geographic localization or environmental conditions.

Genetic diversity within sulfur-oxidizing symbionts displayed by MLST analysis.

We used five markers classified in three categories following Cooper and Feil (Cooper and Feil, 2004): (i) housekeeping genes, (ii) core metabolism gene and (iii) hypervariable genes. As expected, *ITS1* is the most variable marker even if it does not present the higher number of different haplotypes. This is due to the accumulation of polymorphic sites within symbionts of *A. alba* (Fig. 2). The lowest sequence divergence is found in housekeeping genes (*dnaE* and *gyrB*), and metabolism genes (*aprA* and *cbbL*) present an intermediary variability (Table 1). These results are consistent with our initial requirement (*i.e.* greater variability than 16S rRNA) and reveal an intra specific diversity of symbionts associated to these six Lucinidae host species from Lesser Antilles. Indeed, as expected, we observed a mean sequence divergence of approximately 1.5% which is consistent with the literature (Zhang and Hewitt, 2003). However, this diversity could be underestimated due to techniques employed here (*i.e.* direct PCR product sequencing) which detect only the majoritary sequence of each marker. The question is now to determine whether this bacterial diversity is randomly distributed or structured as a function of host diversity, geographic location or environmental factors.

Structuration of symbiont diversity.

In order to test the structuration of sulfur-oxidizing symbiont diversity in Caribbean lucinids, we realized haplotype networks using sequences of our markers. We found that bacterial diversity is structured because whatever the marker considered haplotypes are not randomly distributed among individuals (Fig. 2). Moreover, even if haplotype networks are not

congruent, the same patterns are retrieved for each of them: (i) polymorph for *A. alba* symbionts (ii) polymorph or monomorph for *D. quadrisulcata* symbionts (iii) monomorph for symbionts of the four other host species. The latter observation reveals a specificity of association between *L. pensylvanica* and its symbiont, between *C. orbicularis* and its symbiont, and surprisingly a specificity of association between a particular bacterial strain and two host species (*C. pectinella* and *C. orbiculata*). In addition, this specificity is very unlikely to result from sampling bias since the probability to obtain a particular bacterial sequence by chance for three hosts among 18, is only $4.6 \cdot 10^{-3}$ (i.e. $(3/18)^3$) under the hypothesis than hosts capture their symbionts randomly in the same environmental bacterial population.

Does geography play a role in this structuration?

Our six host species have been sampled in one of three distinct geographic locations: la Désirade (*D. quadrisulcata*), Martinique (*L. pensylvanica*) and Îlet Cochon (*A. alba*, *C. orbicularis*, *C. orbiculata* and *C. pectinella*). Accordingly, the genetic structuration we observed could be due to geography. This criterion could be considered for *D. quadrisulcata* and *L. pensylvanica*. In fact, each of these two species was sampled in geographic locations different from other host species and presents a particular symbiotic haplotype pattern. By contrast the four other host species (*A. alba*, *C. orbicularis*, *C. orbiculata* and *C. pectinella*) do not share the same bacterial haplotype although they have been sampled in the same sea-grass bed (Îlet Cochon). Since geography is obviously not a pertinent explanation here, then which factor may be involved in the structuration we observe in Îlet Cochon?

Ecotype or Phylotype?

Two hypotheses could explain the structuration of symbiotic diversity among the four host/symbiont couples of Îlet Cochon:

(i) The ecotype hypothesis: bacterial population is structured in the environment as a function of ecosystem parameters like sulfur and oxygen concentrations or other gradient in *Thalassia testudinum* sea-grass beds sediments (Fig 4A). According to this hypothesis, the bacterial structuration observed in hosts mimics the structuration of bacterial populations in the environment. Consequently hosts localized at different positions of the sediment column could harbor different bacterial strains. This possibility could be considered for *C. pectinella* and *C. orbiculata* which are only found between 0 and 5 cm of depth due to the length of their siphon (Allen, 1958) and which share for each marker the same bacterial haplotype (Fig. 2). Then, only this bacterial haplotype should be retrieved in superior strata of sediment, in juveniles (or sub-adults) or in any clam found in this superior layer. To test this hypothesis we analyzed the sediment of this layer and also sub-adults of *C. orbicularis* (up to 0.5cm shell-length) sampled in this superior layer. Our results refute the ecotype hypothesis since we detected free-living forms of *C. orbicularis* symbionts in the superior layer of sediment. Moreover, sub-adults of *C. orbicularis* harbor the same bacterial strain as adults (which are distributed through the sediment layer up to 20 cm depth). It thus seems that bacterial population is not structured as a function of sediment depth (Fig. 4B).

(ii) Phylotype hypothesis: structuration as a function of host species could be due to co-evolution of host and bacterial strains. In this case, close host species should harbor close symbiont species. This second hypothesis is rejected here because this pattern is not observed when comparing host phylogeny (Fig. 1) and structured bacterial diversity (Fig.2). Indeed, the two hosts sharing the same bacterial strain (*C. orbiculata* and *C. pectinella* [Fig.2, yellow/red circle]) are not the closest relative at all and belong respectively to A and B Lucinidae clades (Fig. 1). Then, within symbionts of Lucinidae inhabiting *Thalassia testudinum* sea-grass beds

of Îlet Cochon, neither ecotype nor phylotype hypotheses can explain the observed structuration. This leads us to propose that the specific pattern of association between the two partners observed here can only be explained by a local selective process between host species and the symbiotic bacterial pool.

Local selective hypothesis.

How could a selective process between lucinid host species and their symbionts lead to observed structuration? Figure 5 proposes a hypothesis explaining this structuration. The proposed steps are discussed according to the environmental recruitment model (Brissac *et al.*, 2009). Step 1: 4 host species exploit the same bacterial pool. This step corresponds to an initial equilibrium state. Step 2: A mutant for symbiont recognition targets appears in the bacterial population. Step 3: This mutant is not recognized by hosts and its proportion increase in the environment. In fact, selective value of this new mutant is superior to the ancient one because this symbiont escapes to internalization which constitute an evolutionary dead-end (Brissac *et al.*, 2009). Step 4: Apparition of mutant hosts which are able to recognize the new symbiont. These new host variants exploit the new bacterial pool while their conspecifics remain restricted to exploiting the ancient bacterial pool. Step 5: The frequency of these new host individuals increases in case of a selective advantage. In fact, this new bacterial strain could be more efficient in translation to host of fixed carbon. Moreover, the new association could also decrease the “competitions for symbionts” because the new host exploits a new ecological niche constituted by the mutant bacterial pool. Step 6: Constitution of a specific association between the mutated host and the bacterial mutant. Step 7: Bacterial mutants for characters which are not implied in the recognition could appear and continue to be captured by the host. This latter step could both explain the specificity observed here and the presence of polymorphic symbionts (*e.g.* within *A. alba*). Our markers are not implied in recognition and supposed to be neutral. So, the observed structuration reveals a selection of recognition target and a selection by hitchhiking of the alleles of our markers. This selective hypothesis reinforces the environmental recruitment model compared with environmental transmission (Gros *et al.*, 1996) because in this last one it is not obvious that step 6 can occur. In fact, in this case, a new association could not be established since no selective pressure occurs due to the reseeded of the environment by host *via* the release of the symbionts (Brissac *et al.*, 2009). Under such a model (*i.e.* selective hypothesis in environmental recruitment), we must expect that in Îlet Cochon one host could not be associated with another bacterial strain than its own. The fact that *C. orbiculata* did not become infected by symbionts from *C. orbicularis* gill extracts agree in favor of our model. The selective hypothesis could therefore explain the observed intra-specific structuration of symbionts in *T. testudinum* sea-grass beds of the Îlet Cochon.

In conclusion the six host species inhabiting *T. testudinum* sea-grass beds in the Lesser Antilles share the same bacterial species (according to 16S rRNA sequences). However our MLST analysis reveals a pattern of intra-specific genetic diversity of symbionts. This pattern seems both to have a geographic and also a host-species component which could be explained by Red-Queen selective process (Van Valen, 1973).

Material & Methods

Specimen collection.

Individuals of *Anodontia alba* (Link, 1807), *Codakia orbicularis* (Linné, 1758), *Codakia orbiculata* (Montagu, 1808), *Codakia pectinella* (Adams, 1852), were collected in Guadeloupe (“Îlet Cochon” 16°12'53.76"N; 61°32'05.74"W). For *Divaricella quadrisulcata* (Orbigny, 1842), specimens were collected in la Désirade (“plage des galets” 16°17'46.88"N; 61°04'53.77"W). Specimens of *Linga pensylvanica* (Linné, 1758) were collected in Martinique (“Anse Macabou” 14°31'01.52"N; 60°49'00.86"W).

All individuals were collected by hand in (or near) *Thalassia testudinum* sea-grass beds. Gills (which harbor symbionts) and other symbiont-free tissues (*e.g.* foot) were conserved in absolute ethanol before investigation.

Multi-Locus Sequence Typing.

We used in this study three types of markers: (i) two housekeeping genes already used for typing purposes in the literature: DNA Polymerase III alpha-subunit (*dnaE*) (Byun *et al.*, 1999) and DNA Gyrase subunit B (*gyrB*) (Holmes *et al.*, 2004), (ii) the Internal Transcribed Spacer (*ITS1*), an hypervariable region comprised between 16S and 23S rRNA genes, and (iii) two metabolic genes already used to characterize symbiont metabolic pathway in Lucinidae: Ribulose-1,5-bisPhosphate Carboxylase/Oxygenase (RubisCO [*cbbL*]) for chemoautotrophy and Adenylyl-1,5-bisPhosphate Reductase alpha-subunit (APS Reductase [*aprA*]) for sulfur-oxidizing metabolism (Duperron *et al.*, 2007). Corresponding sequences of lucinid sulfur-oxidizing symbionts were obtained by nested-PCR on *C. orbicularis* (see below) except for RubisCO for which literature primers were used (Elsaied and Naganuma, 2001). The sequences used for polymorphism analysis were obtained by PCR with specific primers (Table 2).

DNA Preparation.

Template DNA for PCR amplifications was extracted from symbiont-containing gills and symbiont-free foot tissue of each bivalve hosts according to the CTAB method (Ishaq *et al.*, 1990). DNA concentration was determined by spectrometry (BioPhotometer, Eppendorf) and on a 0.8% agarose gel in comparison with a concentration marker (Smart Ladder, Eurogentec).

Nested-PCR amplifications.

Few data for these genes within sulfur-oxidizing symbionts being available in databases, we determined their sequences for lucinid sulfur-oxidizing symbionts. Two-step Nested-PCR amplifications were realized with DNA extracted from *C. orbicularis* gills. The first step was performed in 25µL, using degenerated “nested-primers” (Table 2) and 10-25ng of symbiont+host template DNA mixture. The second amplification was performed in the same conditions with “degN primers” instead of “nested-primers” and 1µL of a 100-fold to 1000-fold dilution of the first amplification as a template. Conserved sites flanking more variable regions were determined from aligned bacterial sequences using SVARAP 2.0 (Colson *et al.*, 2006). Degenerated “nested” and “degN” primers were then designed in these conserved regions.

Specific PCR amplifications.

Specific primers were designed using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi> (Rozen and Skaletsky, 2000)). Bacterial sequences were amplified from host+symbiont DNA mixture using primers presented in Table 2. Amplification was performed in a final volume of 50µL using 10-25ng of DNA template, 1X Taq Buffer (Invitrogen), 3mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,4mM of each dNTP, 1mM of each primer and 2 units of recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen). Amplicons were then directly sequenced (GATC-biotech, www.gatc-biotech.com).

Sediment analysis.

Sediment from the superficial layer (0-5cm) of *Thalassia testudinum* sea-grass beds was collected in Îlet Cochon and total DNA was extracted following Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 1996). A 3-step nested PCR was realized using 50ng of DNA template and “nested” primers (Table 2) as a first step. A 100-fold dilution of this PCR-product was then used as template for a second amplification with “degN” primers (Table 2) and the procedure was repeated for a last step with specific primers. Fragments of interest were then eluted from 1% agarose gel using Nucleospin® Extract II kit (Macherey-Nagel) and cloned with pGEM-T® TA cloning kit (Promega) according to manufacturers instructions. This vector was used to transform Dh5α competent *Escherichia coli* (Promega) and plasmids from positives clones were collected using the Nucleospin® plasmid kit (Macherey-Nagel). Inserts were then sequenced directly using a ABI PRISM automated sequencer (Genome express, www.gexbyweb.com).

Host sequences.

DNA extracted from symbiont-free foot tissue was used in order to amplify 18S rRNA and 28S rRNA. The PCR were realized in the same conditions as symbiont-specific PCR amplification. PCR products were then directly sequenced and phylogenetically analyzed.

Phylogenetic analysis.

Sequences were controlled by BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and aligned with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) with default parameters. The alignment was then eye-checked and corrected if necessary. Gap positions and ambiguous sites were removed using the online Gblocks server (Castresana, 2000). The alignment was then imported in the TOPALi v2.5 software (Milne *et al.*, 2004) to define the substitution model applied to each dataset using ModelGenerator (Keane *et al.*, 2006). The best model was chosen using the Bayesian Information Criterion (BIC) (Schwarz, 1978). Phylogenetic analyses were then performed with TOPALi v2.5, trees being then estimated by Maximum Likelihood (ML) using PhyML (Guindon and Gascuel, 2003) and by Bayesian Inference (BI) using MrBayes 3 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Support for individual clades was evaluated using non-parametric bootstrapping (Felsenstein, 1985) obtained from 100 replicates ML. Posterior probabilities for BI were also evaluated for each node.

Polymorphism analysis.

MLST symbiont sequences for each gene were analyzed using DNAsp4 (Rozas *et al.*, 2003) and results are presented in Table 1. Haplotype networks were realized using NETW4510© (Fluxus Technology Ltd.) using Median Joining method (Bandelt *et al.*, 1999).

Cross-infections experiments.

Twenty *C. orbiculata* individuals were purged of their symbionts by 9 month starvation in oxygenated tanks with no sulfur added. Clams were then dispatched in four oxygenated crystallizing dishes. Purified symbiont fractions realized according to Caro *et al.* (Caro *et al.*, 2007) from *C. orbicularis* or *C. orbiculata* gills from freshly collected animals, were added every two days into the batches. A part of these extracts was conserved in 100% ethanol for molecular analysis. Individuals were sacrificed every four days in order to follow a possible infection of starved hosts. For each sacrificed individual, one gill was conserved for molecular investigation (100% ethanol) and the other one was directly fixed (2% paraformaldehyde in 0.2µm filtered seawater for 3h at 4°C) for CARD-FISH. Slides and CARD-FISH experiments were realized according to Brissac *et al.* (2009).

Acknowledgments

We thank, Denis Poinsoit and Clémentine Vitte for English revision. T.B is funded as PhD Student by a MENRT grant (Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et des Technologies).

References

- Allen JA (1958). On the Basic Form and Adaptations to Habitat in the Lucinacea (Eulamellibranchia). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **241**: 421-484.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* **16**: 37-48.
- Blazejak A, Kuever J, Erseus C, Amann R, Dubilier N (2006). Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (oligochaeta) from Bermuda and the Bahamas. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5527-36.
- Brissac T, Gros O, Mercot H (2009). Lack of endosymbiont release by two Lucinidae (Bivalvia) of the genus *Codakia*: consequences for symbiotic relationships. *FEMS Microbiol Ecol* **67**: 261-7.
- Byun R, Elbourne LD, Lan R, Reeves PR (1999). Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. *Infect Immun* **67**: 1116-24.
- Caro A, Gros O, Got P, De Wit R, Troussellier M (2007). Characterization of the population of the sulfur-oxidizing symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by single-cell analyses. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2101-9.
- Cary SC, Warren W, Anderson E, Giovannoni SJ (1993). Identification and localization of bacterial endosymbionts in hydrothermal vent taxa with symbiont-specific polymerase chain reaction amplification and in situ hybridization techniques. *Mol Mar Biol Biotechnol* **2**: 51-62.
- Castresana J (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-52.
- Colson P, Tamalet C, Raoult D (2006). SVARAP and aSVARAP: simple tools for quantitative analysis of nucleotide and amino acid variability and primer selection for clinical microbiology. *BMC Microbiol* **6**: 21.

- Cooper JE, Feil EJ (2004). Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol* **12**: 373-7.
- DeChaine EG, Cavanaugh CM (2006). Symbioses of methanotrophs and deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae). *Prog Mol Subcell Biol* **41**: 227-49.
- Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, McCracken VJ, Aminov R, Mackie RI *et al* (2000). Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2166-74.
- Di Meo CA, Wilbur AE, Holben WE, Feldman RA, Vrijenhoek RC, Cary SC (2000). Genetic variation among endosymbionts of widely distributed vestimentiferan tubeworms. *Appl Environ Microbiol* **66**: 651-8.
- Distel DL, Felbeck H, Cavanaugh CM (1994). Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbiont and their Bivalve hosts. *J Mol Evol* **38**: 533-542.
- 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**: 2506-10.
- Dubilier N, Bergin C, Lott C (2008). Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* **6**: 725-40.
- Dubilier N, Giere O, Distel DL, Cavanaugh CM (1995). Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (Oligochaeta: Annelida) by phylogenetic 16S rRNA sequence analysis and in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2346-50.
- Duperron S, Fiala-Medioni A, Caprais JC, Olu K, Sibuet M (2007). Evidence for chemoautotrophic symbiosis in a Mediterranean cold seep clam (Bivalvia: Lucinidae): comparative sequence analysis of bacterial 16S rRNA, APS reductase and RubisCO genes. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 64-70.
- 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**: 433-45.
- Duperron S, Laurent MC, Gaill F, Gros O (2008b). Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of Mytilidae associated with wood falls. *FEMS Microbiol Ecol* **63**: 338-49.
- Durand P, Gros O (1996). Bacterial host specificity of Lucinacea endosymbionts: interspecific variation in 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **140**: 193-8.
- Durand P, Gros O, Frenkiel L, Prieur D (1996). Phylogenetic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three tropical Lucinidae by 16S rDNA sequence analysis. *Mol Mar Biol Biotechnol* **5**: 37-42.
- Elsaied H, Naganuma T (2001). Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1751-65.
- Felbeck H, Childress JJ, Somero GN (1981). Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* **293**: 291-3.
- Feldman RA, Black MB, Cary CS, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1997). Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. *Mol Mar Biol Biotechnol* **6**: 268-77.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Fisher CR (1990). Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev. Aquat. Sci* **2**: 399-613.
- Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P, Jr. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 166-70.

- Gros O, Darrasse A, Durand P, Frenkiel L, Mouëza M (1996). Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2324-30.
- Gros O, De Wulf-Durand P, Frenkiel L, Mouëza M (1998). Putative environmental transmission of sulfur-oxidizing bacterial symbionts in tropical lucinid bivalves inhabiting various environments. *FEMS Microbiol Lett* **160**: 257-262.
- Gros O, Duplessis MR, Felbeck H (1999). Embryonic Development and endosymbiont transmission mode in the symbiotic clam *Lucinoma aequizonata* (Bivalvia:Lucinidae). *Invert Reprod Dev* **36**: 93-103.
- Gros O, Frenkiel L, Felbeck H (2000). Sulfur-oxidizing endosymbiosis in *Divaricella quadrisulcata* (Bivalvia: Lucinidae): Morphological, ultrastructural, and phylogenetic analysis. *Symbiosis* **29**: 293-317.
- Gros O, Liberge M, Felbeck H (2003a). Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Mar Biol* **142**: 57-66.
- Gros O, Liberge M, Heddi A, Khatchadourian C, Felbeck H (2003b). Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (*Thalassia testudinum* environment). *Appl Environ Microbiol* **69**: 6264-7.
- Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704.
- Holmes DE, Nevin KP, Lovley DR (2004). Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB and fusA genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1591-9.
- Ishaq M, Wolf B, Ritter C (1990). Large-scale isolation of plasmid DNA using cetyltrimethylammonium bromide. *Biotechniques* **9**: 19-20, 22, 24.
- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McLnerney JO (2006). Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* **6**: 29.
- Lane DJ (1991). 16S/23S Sequencing. In: Stackebrandt E GM (ed). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons.: New York. pp 115-175.
- Milne I, Wright F, Rowe G, Marshall DF, Husmeier D, McGuire G (2004). TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* **20**: 1806-7.
- Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA, Littlewood DT (2003). Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int J Parasitol* **33**: 733-55.
- Peek AS, Feldman RA, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1998). Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9962-6.
- Piednoel M, Bonnivard E (2009). DIRS1-like retrotransposons are widely distributed among Decapoda and are particularly present in hydrothermal vent organisms. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 86.
- Polz MF, Cavanaugh CM (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7232-6.
- Polz MF, Distel DL, Zarda B, Amann R, Felbeck H, Ott JA *et al* (1994). Phylogenetic analysis of a highly specific association between ectosymbiotic, sulfur-oxidizing bacteria and a marine nematode. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4461-7.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-4.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496-7.
- Rozen S, Skaletsky H (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-86.

- Schwarz G (1978). Estimating the Dimension of a Model. *Ann. Statist.* **6**: 461-464.
- Stewart FJ, Newton IL, Cavanaugh CM (2005). Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic-anoxic interfaces. *Trends Microbiol* **13**: 439-48.
- Tanabe Y, Kasai F, Watanabe MM (2007). Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbiology* **153**: 3695-703.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-80.
- Van Valen L (1973). A new evolutionary law. *Evol. Theory* **1**: 1-30.
- Williams ST, Taylor JD, Glover EA (2003). Molecular Phylogeny of the Lucinoidea (Bivalvia): Non-Monophyly and Separate Acquisition of Bacterial Chemosymbiosis. *J Molluscan Stud* **70**: 187-202.
- Winnepenninckx BM, Reid DG, Backeljau T (1998). Performance of 18S rRNA in littorinid phylogeny (Gastropoda: Caenogastropoda). *J Mol Evol* **47**: 586-96.
- Woese CR (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-71.
- Won YJ, Hallam SJ, O'Mullan GD, Pan IL, Buck KR, Vrijenhoek RC (2003). Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *bathymodiolus*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6785-92.
- Woyke T, Teeling H, Ivanova NN, Huntemann M, Richter M, Gloeckner FO *et al* (2006). Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* **443**: 950-5.
- Zhang DX, Hewitt GM (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* **12**: 563-84.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316-22.

Title and legend to figures

Figure Legends

Figure 1. Molecular phylogeny of Lucinidae realized using concatenated sequences from 18S and 28S rRNA genes (1391bp). Tree was reconstructed using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) methods under TrNef+ Γ (ML) and K80+ Γ (BI) evolutionary models with Crassatellidae and Thyasiridae as outgroups. For robustness of the clades, only bootstrap values (ML, 100 replicates [under branches]) and Posterior Probabilities (BI [above branches]) up to 80% were displayed. Sequences obtained in this study are in bold and other sequences provide from Williams *et al.* (2003). ^aOur sequences are identical to those published by Williams *et al.* (2003).

Figure 2. Bacterial haplotypes networks realized using sequences from MLST genes. Networks were reconstructed using Median Joining method. Circles represent haplotypes (H1 to H6) and size of them is proportional to number of sequences for each haplotype. Colors of circle represent the host species harboring the bacterial sequences: blue for *C. orbicularis*, green for *L. pensylvanica*, red for *C. orbiculata*, yellow for *C. pectinella*, purple for *A. alba* and black for *D. quadrisulcata*. Each bar on branches represents one substitution.

Figure 3. CARD-FISH on slide with symco2A probe on *Codakia orbiculata* starved individuals after addition of purified symbionts from *C. orbicularis* or *C. orbiculata*. (A) Gill section of freshly collected *C. orbiculata* (CARD-FISH positive control). (B) Gill section of *C. orbiculata* after 9 months of starvation (negative control). (C and D) Gill sections of starved *C. orbiculata* after addition of *C. orbicularis* gill extract during 4 days (C) or 8 days (D). (E and F) Gill sections of starved *C. orbiculata* after addition of *C. orbiculata* gill extract during 4 days (E) or 8 days (F). Scale bars=10 μ m. Ciliated zone (CZ). Lateral zone (LZ). Arrows represent marked symbionts.

Figure 4. Hypothetical distributions of symbionts in *Thalassia testudinum* sea-grass beds from Îlet Cochon (Guadeloupe). (A) Bacterial population structured in function of oxygen (O_2), sulfur (H_2S) or other gradient. (B) Non structured bacterial population. Circles correspond to hosts and triangle to symbionts. Colors correspond to host species (circles) or bacterial strains (triangles): blue for *C. orbicularis*, Pale blue for juvenile of *C. orbicularis*, yellow for *C. orbiculata*, red for *C. pectinella* and purple for *A. alba*.

Figure 5. Schematic representation of evolutive process which could lead to the pattern of structuration observed in *Thalassia testudinum* sea-grass bed of Îlet Cochon. This scheme shows at the final step the structured observed pattern with MLST analysis (Association between *A. alba* and its strain in purple, between *C. orbicularis* and its one in blue and association implying *C. orbiculata* and *C. pectinella*). Circles represent bacterial pools. Squares, crosses, triangles and diamonds represent host species. Colors discriminates specifically established association. Double arrows represent established association. Dotted double arrows represent host species where individuals exploit different bacterial pools. Dashed arrow represent apparition of bacterial mutant. Dashed/dotted arrow represent apparition of host which are able to exploit escaped mutants.

Figures

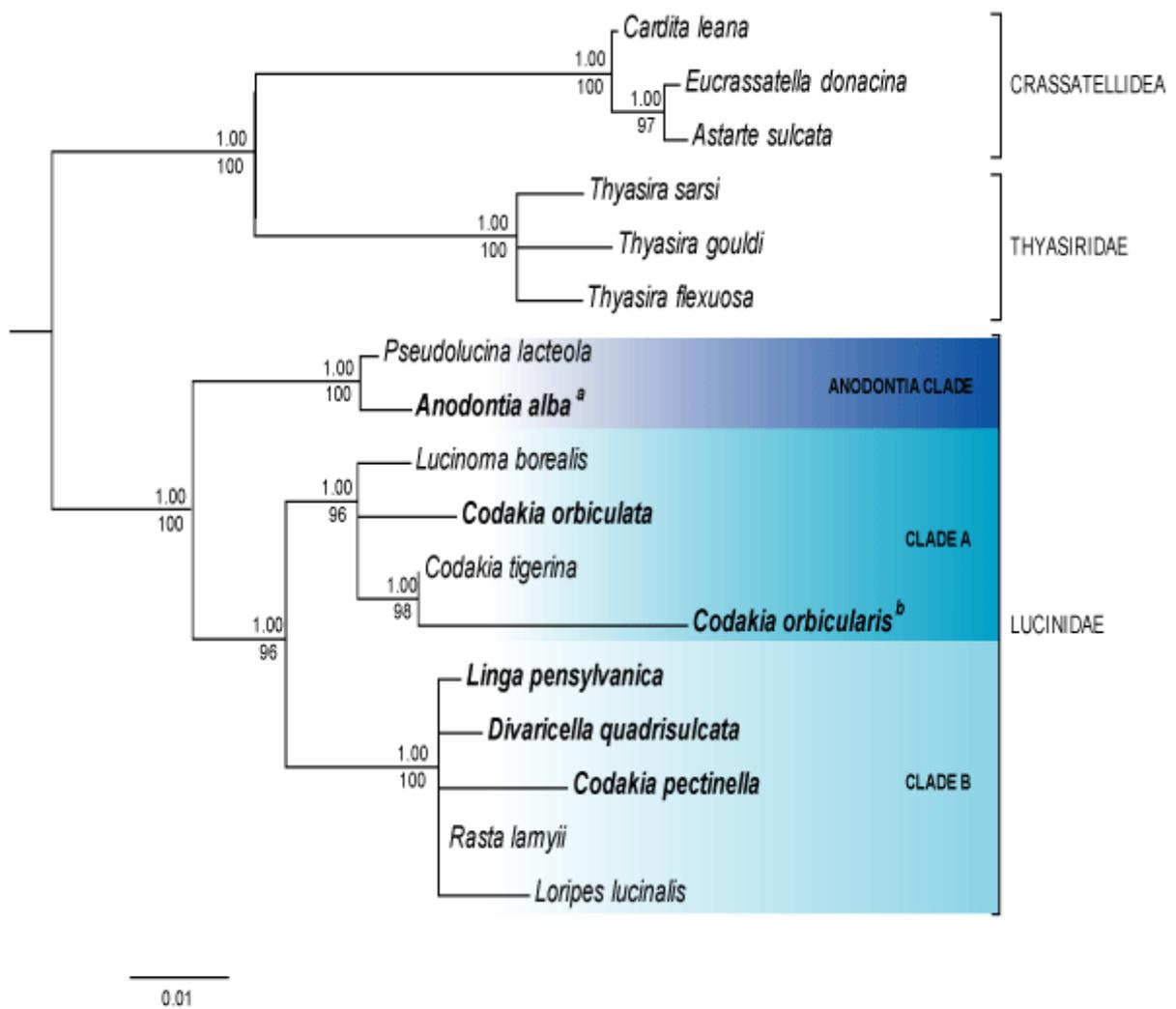


Figure 1. Molecular phylogeny of Lucinidae realized using concatenated sequences from 18S and 28S rRNA genes (1391 bp).

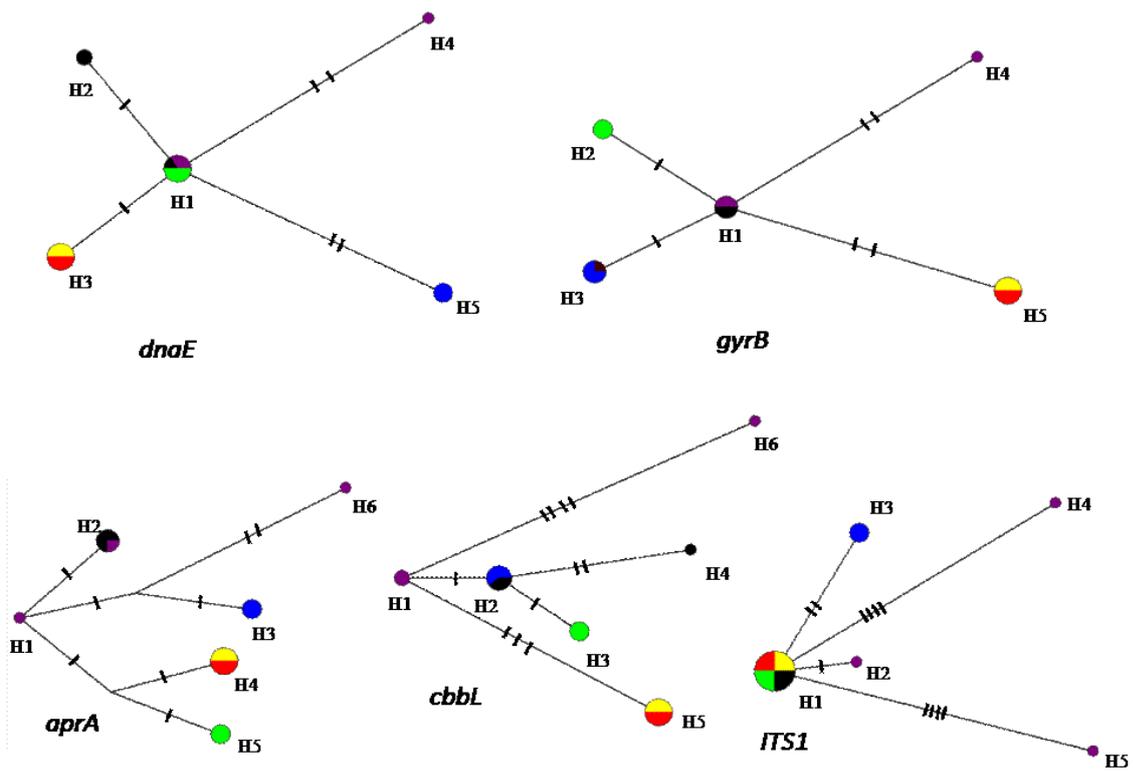


Figure 2. Bacterial haplotypes networks realized using sequences from MLST genes.

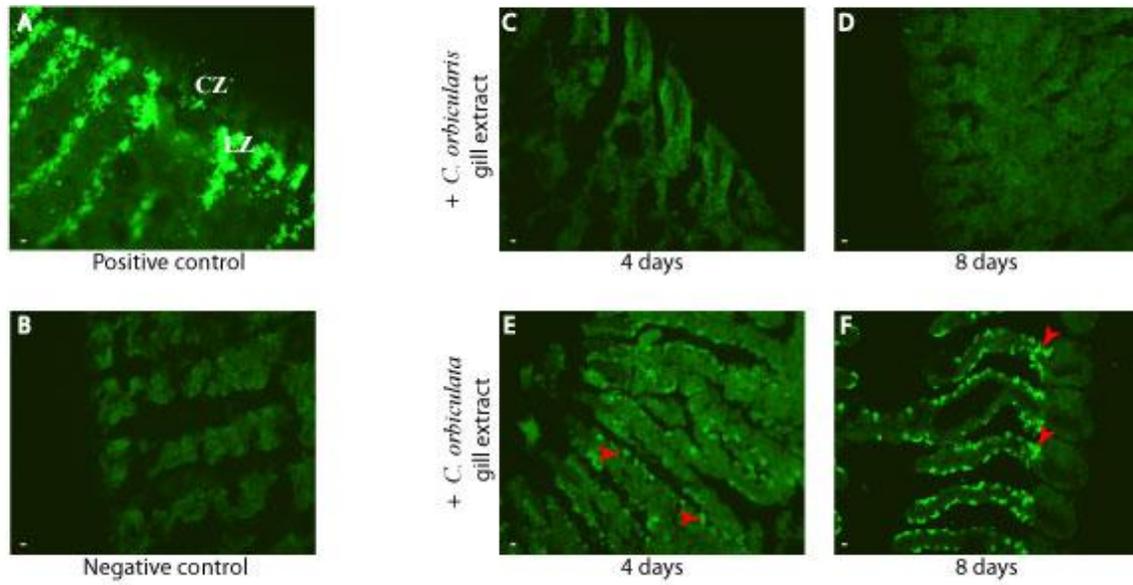


Figure 4. CARD-FISH on slide with symco2A probe on *Codakia orbiculata* starved individuals after addition of purified symbionts from *C. orbicularis* (C and D) or *C. orbiculata* (E and F)

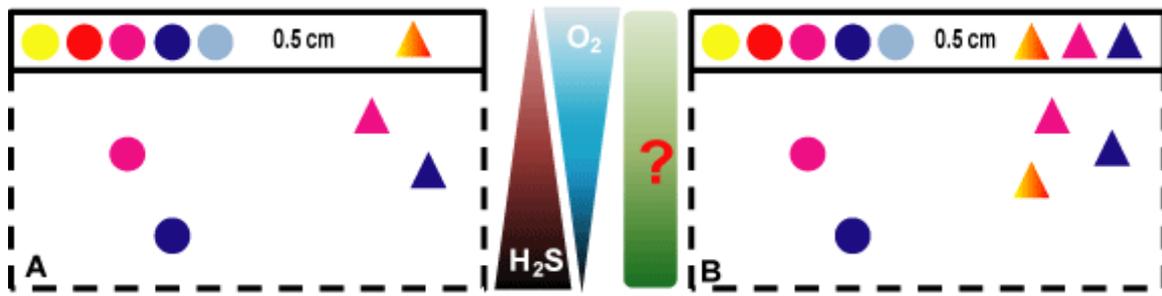


Figure 4. Hypothetical distributions of symbionts in *Thalassia testudinum* sea-grass beds from Îlet Cochon (Guadeloupe)

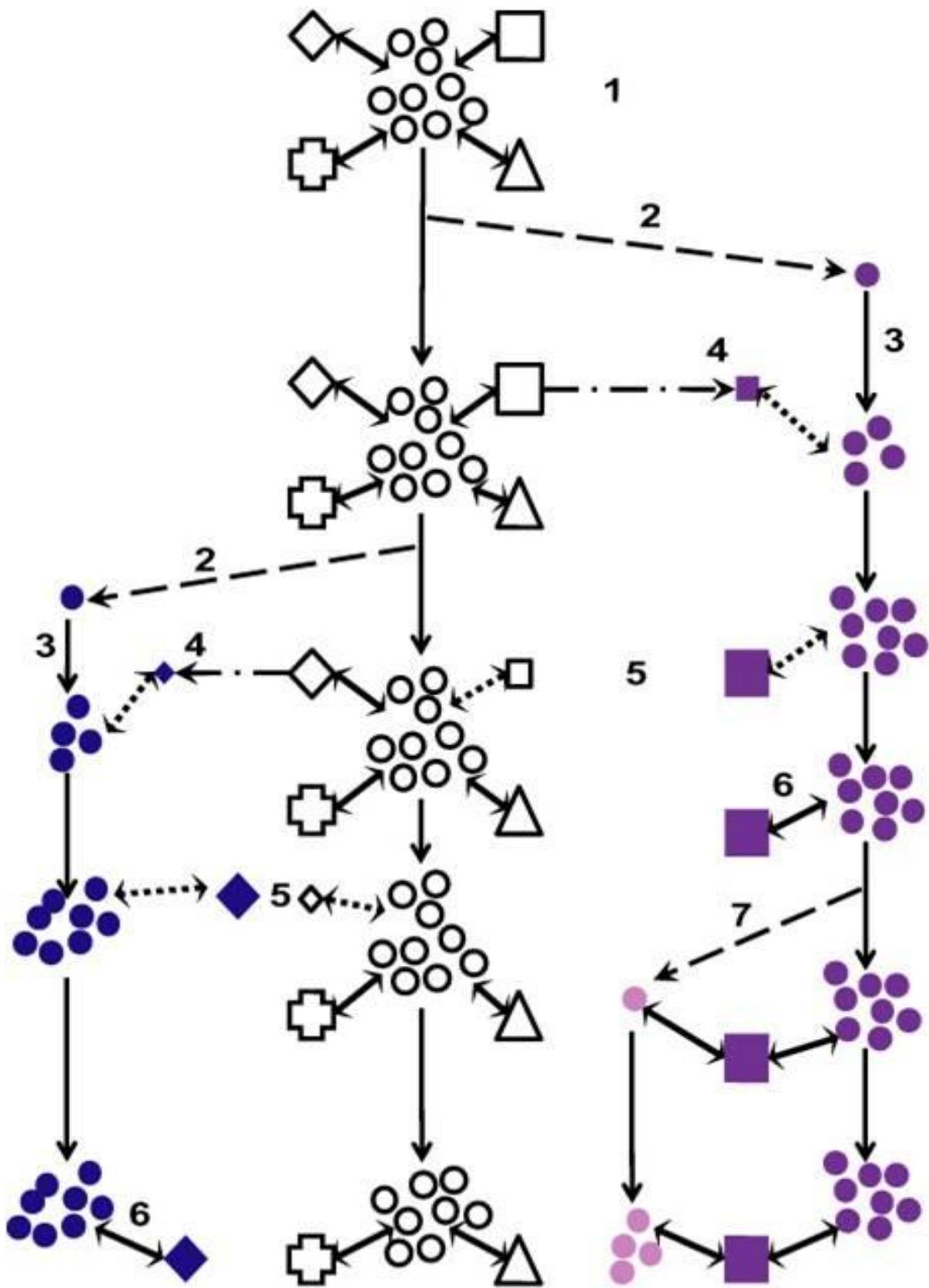


Figure 5. Schematic representation of evolutive process which could lead to the pattern of structuration observed in *Thalassia testudinum* sea-grass beds of Îlet Cochon.

Tables

Table 1. Polymorphism analysis data.

Gene ¹	Sequences		Polymorphic sites ²	Haplotypes	Accession numbers
	Nb	Length (bp)			
<i>dnaE</i> (~3,5 kb)	18	465	6 (1.29 %)	5	To be submitted
<i>gyrB</i> (~2,4 kb)	18	806	6 (0.74 %)	5	To be submitted
<i>ITS1</i> (~550 pb)	18	512	11 (2.14 %)	5	To be submitted
<i>aprA</i> (~1 kb)	18	492	8 (1.62 %)	6	To be submitted
<i>cbbL</i> (~1,5 kb)	18	600	11 (1.83 %)	6	To be submitted
TOTAL	90	2875	42 (1.46 %)		

¹ gene names. *dnaE*: DNA Polymerase III α -subunit, *gyrB*: DNA Gyrase β -subunit, *ITS1*: 16S/23S Internal Transcribed spacer, *aprA*: Adenylyl,5-bisPhosphate Reductase α -subunit, *cbbL*: Ribulose-1,5-bisPhosphate Carboxylase/Oxygenase Large subunit.

² Percentages represent number of polymorphic sites in relation to the length of the considered fragment.

Table 2. Primers and PCR conditions used for each gene analyzed.

	Primers		PCR Conditions				
	Name	Séquence(5'->3')	Expected size (bp)	Targeted gene	Optimal Tm (°C)	Cycles	Ref ²
Host	18S-5'f	CTGGTTGATYCTGCCAGT	1000	18S	54	30	1
	18S-1100r	CTTCGAACCTCTGACTTTGG		rRNA			2
	28S_LSU-900f	CCGTCTTGAAACACGGACCAAG	700	28S	52	40	3
	28S_LSU-1600r	AGCGCCATCCATTTTCAGG		rRNA			2
16Suniv-27f	AGAGTITGATCMTGGCTCAG	1465	<i>rrs</i>	54	30	4	
16Suniv-1492r	TACGGYTACCRRGTTACGACIT						
ITS-degN-1242f	GCTACACACGTGCTACAATGG	~1000	<i>ITS1</i>	54	35	5	
ITS-degN-196r	TCTCGGTTGATTTCTTTTCTT						
ITS-Symb-282f	GGAGTGGGTTGXAAAAGAAG	712		58	30		
ITS-Symb-954r	ATCGCAAGCTACAACGTCCT						
Symbiont ¹	dnaE-nested-1069f	CCDGTGDDGGICDGGICGYGGC	1171		46	35	
	dnaE-nested-2279r	TGNGATTTTRTTRAANCCRTA					
	dnaE-degN-1180f	CCIGARCGKGTITCIATGCC	857	<i>dnaE</i>	60	35	5
	dnaE-degN-2076r	YTGCATNACYTYTCYTGRTA					
	dnaE-Symb-201f	GAAGATGATCCCCTTCGAGA	667		64	30	
	dnaE-Symb-810r	GTAGGAGACCTTGGCACGAC					
	gyrB-nested-217f	GHAARCGYCCDGGYATGTA	1409		56	35	
	gyrB-nested-1809r	CVACRTCVCATCBGTCAT					
	gyrB-degN-277f	GGTDTTYGARRTDGTDGATAA	1130	<i>gyrB</i>	56	35	5
	gyrB-degN-1590r	CHGCNGARTCMCCYTCMAC					
gyrB-Symb-185f	AGCCACCCGAAGAGAAGAA	932		58	30		
gyrB-Symb-1150r	TGGCAGACCGGCTATGT						
CBBL-1B	CACCTGGACCACVGTBTGG	800	<i>cbbL</i>	60	30	6	
CBBL-2C	CGGTGYATGTGCAGCAGCATGCC						
aprA-Symb-23f ³	GCAACGACCTGATGGGTATC	532	<i>aprA</i>	58	33	5	
aprA-Symb-555r ³	GTCGGTACGAAGCGGTTTT						

¹“nested” and “degN” primers correspond to degenerated primers used in nested-PCR. “Symb” primers correspond to specific primers designed using sequences obtained by nested-NCR.

²References: 1 (Winnepenninckx *et al.*, 1998), 2 (Williams *et al.*, 2003), 3 (Olson *et al.*, 2003), 4 (Lane, 1991), 5 this study, 6 (Elsaied and Naganuma, 2001).

³These primers were designed using specific sequence for symbiont Lucinidae obtained using method derivate from TE-walking (Piednoel and Bonnivard, 2009) from a “core sequence” amplified using APS-FW and APS-RV primers (Deplancke *et al.*, 2000).

ARTICLE 3 : BRISSAC ET AL.

Soumis à *FEMS Microbiol. Ecol.*

**Only one majority sulfur-oxidizing symbiotic species occurs within
Lucinidae (Bivalvia).**

Terry Brissac^{1*}, Hervé Merçot¹ and Olivier Gros²

¹UMR 7138 UPMC-CNRS-MNHN-IRD « Systématique, Adaptation, Évolution », Equipe: « Génétique & Evolution », Université Pierre et Marie Curie, Bat. A, 4^{ème} étage, 7 quai S^t Bernard, 75005 Paris, France.

² UMR 7138 UPMC-CNRS-MNHN-IRD « Systématique, Adaptation, Évolution », Equipe: « Symbiose », Département de Biologie, Université des Antilles et de la Guyane B.P. 592, 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe (France).

Running title: Phylogenetic comparison of host and symbionts within Lucinidae

Keywords: Bivalvia; Comparative molecular phylogeny; EFTEM analysis; EELS; ESI; Hemoglobin.

Introduction

Associations between chemoautotrophic bacteria and marine invertebrates were discovered in hydrothermal vents by Felbeck *et al.* (1981). Later, they were described in shallow water sediments (Berg & Alatalo, 1984; Schweimanns & Felbeck, 1985), cold seeps (Juniper & Sibuet, 1987) whales bones (Deming *et al.*, 1997) and sunken woods (Gros & Gaill, 2007). This type of associations is present in several host taxa and implies various bacterial clades and metabolisms (Dubilier *et al.*, 2008). Among these associations, one of them concerns Lucinidae (Bivalvia) which constitutes the most diverse bivalve family, live in a large variety of marine habitats and are very widespread (Taylor & Glover, 2005). To date, all Lucinidae genera studied harbor sulfur-oxidizing gamma-proteobacterial symbionts (according to 16S rRNA sequences) localized in specialized cells, distributed throughout the lateral zone of gill filaments, named bacteriocytes (Fisher, 1990).

Within Lucinidae, the capacity to establish symbiotic relationship seems to be an ancestral heritage. In fact, it seems that symbiosis was acquired near -250 MY before divergence of the different families (Thyasiridae, Lucinidae, Ungulinidae, Fimbriidae) belonging the Lucinacea super-family (Newell, 1969; Boss, 1970). Thus, such symbiotic associations led Reid (1990) to consider that the onset of symbiosis was the most important factor in the subsequent evolution of the Lucinacea. Nevertheless, origin and evolutionary story of current symbiotic couples remain obscure and ambiguous (Distel *et al.*, 1994; Durand & Gros, 1996). In fact, the two partners of actual couples could have coevolved or not from an ancestral symbiotic couple. One way to distinguish between these alternatives is the comparison of host and symbionts molecular phylogenies (Peek *et al.*, 1998b). In fact in case of co-evolution, the two partners must share a strong common evolutionary history and the two phylogenies must be congruent.

Separate molecular data concerning sequences of host or symbiont has already been provided in the literature for Lucinidae but host/symbiont sequences direct comparison has not been realized yet for this bivalve family. On one side, molecular data concerning hosts have already been used in order to investigate relation between Lucinoidea (Williams *et al.*, 2003). On the other side, 16S rRNA sequences were analyzed in order to study diversity of these symbioses (Distel *et al.*, 1988; Distel *et al.*, 1994; Durand & Gros, 1996; Durand *et al.*, 1996). Related to hosts, Distel *et al.* (1988; 1994) showed specifically associated unique bacterial ribotype per host species. Later, Durand & Gros (1996), Durand *et al.* (1996), Gros *et al.* (2000; 2003) observed 6 host species which harbor the same symbiont species (100% of identity on 16S rRNA sequences). If under the first observations it seems that there are species-specific associations due to co-evolution of lucinid clams and their symbionts, ulterior studies can not support this hypothesis. However in these studies, molecular diversity of symbionts is compared to host morphological taxonomy and not to host molecular phylogeny. Moreover, sampling strategies were very different, Distel *et al.* (1988; 1994) sampling (which studied specimen from various ecosystem and geographic localization) being more heterogeneous than Durand & Gros (1996), Durand *et al.* (1996), Gros *et al.* (2000; 2003) one, which studied Lucinidae specimen from *Thalassia testudinum* sea-grass beds of Lesser Antilles.

In this paper we study from a molecular point of view, Lucinidae and their bacterial symbionts from Philippines (with additional data already published providing from various area), in order to study evolutionary history of symbiotic current couples. Thus, we realize the

comparison of molecular phylogenies of diverse Lucinidae hosts (using 18S rRNA and 28SrRNA) and their associated symbionts (using 16S rRNA and APS Reductase [*aprA*] sequences). In addition, according to the particular way of life of Lucinidae (*i.e.* chemosymbiosis) we conduct on Philippines samples ultrastructural (gills and symbionts) and histochemical (occurrence of hemoglobin) analyses.

Material and Methods

Sampling

Philippine clams: Samples (Table 1) were collected during the Panglao cruise in May 2005 (chief scientist: P. Bouchet) in the Bohol sea [8,3-9,6° N and 123-124° E] using a beam trawl at depths ranging between 219 and 1775 meters. Samples were processed on the ship within 1 hour after collection. For each lucinid specimen, the gills were dissected and treated according to the following protocol: First gill piece was stored in 100% ethanol for molecular investigation of bacterial diversity and host phylogeny (see below). Second gill piece was prepared for electron microscopy. *Codakia orbicularis* and *Lucina pectinata* were sampled by hand respectively in *Thalassia testudinum* sea-grass beds of “Ilet Cochon” (Guadeloupe) and mangrove swamps of “La manche à eau” (Guadeloupe) in 2006.

Transmission Electron Microscopy (TEM) preparation

Gills were prefixed on ship for one hour at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M pH 7.2 cacodylate buffer, adjusted to 900 mOsM with NaCl and CaCl₂ in order to improve membrane preservation. Gills were briefly rinsed in the same buffer before to be stored in the same buffer at 4°C until they were brought to the laboratory 2-3 weeks after. Samples were fixed for 45 minutes at room temperature in 1% osmium tetroxide in the same buffer, then rinsed in distilled water and post-fixed with 2% aqueous uranyl acetate for one hour before embedding, sectioning (60nm thick), and observation with a Leo-912 microscope at 80kV.

EFTEM analysis: PEELS and ESI procedures

The EFTEM observations were performed using a LEO 912 Omega transmission electron microscope (LEO Electron Optics GmbH, Oberkochen, Germany) at 120 kV. Acquisition was accomplished with the ESIVision program (versions 3.0 Soft-Imaging Software, SIS, GmbH, D-48153 Münster). For PEELS acquisition, the primary magnification was set to a small area delimited by the entrance aperture of the spectrometer. For ESI acquisition and to minimize the radiation damage we used the three-window method (Jeanguillaume *et al.*, 1978; Reimer *et al.*, 1991), as described in (Lechaire *et al.*, 2008).

DNA template preparation

Template DNA for PCR amplifications was extracted from symbiont-containing gills of each bivalve hosts according the CTAB (CetylTrimethyl Ammonium Bromide) method (Ishaq *et al.*, 1990). DNA concentration was determined by spectrometry (BioPhotometer, eppendorf) and on a 1% agarose gel in comparison with a concentration marker (Smart Ladder, Eurogentec).

PCR amplifications

Bacterial (16S rRNA and APS reductase) or host (18S rRNA and 28S rRNA) genes were amplified from host-symbiont DNA mixture using primers presented in Table 2. Amplification was performed in 50µL using between 25 to 50ng of DNA template, 5µL of 10X Taq buffer (Invitrogen), 3mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.4mM of each dNTP, 1mM of each primer and 1 units of recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen). Target DNA were amplified in 30 cycles (94°C for 1min, optimal T_m for 1 min [Table 2], 72°C for 1 min [1 min 30 sec for 16S rRNA]) with an initial denaturation step at 94°C for 10 min and a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR products were controlled on a 1% agarose gel and directly sequenced using ABI Prism automated sequencer (GATC-biotech, <http://www.gatc-biotech.fr>)

Phylogenetic analyses

Sequences were controlled by BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and aligned with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) with default parameters. The alignment was then eye-checked and corrected if necessary. Gap positions and ambiguously sites of the alignment were removed using Gblocks 0.91b (Castresana, 2000). Alignment was then imported in the TOPALi v2.5 software (Milne *et al.*, 2004) in order to define using ModelGenerator (Keane *et al.*, 2006) the substitution model which will be used for each dataset. The best model for each dataset is chosen using Bayesian Information Criterion (Schwarz, 1978). Phylogenetic analyses were then performed with TOPALi v2.5, trees being then estimated by Maximum Likelihood (ML) using PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) and by Bayesian Inference (BI) using MrBayes 3 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Support for individual clades was evaluated using non-parametric bootstrapping (Felsenstein, 1985) obtain from 100 replicates for ML. Posterior probabilities for BI were also evaluated for each node.

Results

Symbiont phylogeny

All PCR amplifications of 16S rRNA or *aprA* sequences gave fragments of the expected size (~1500bp and ~300bp respectively). Direct PCR product sequencing and chromatograph analysis indicate that for each amplification only one single detectable sequence. Symbionts phylogenetic trees (Fig. 1 and 2) were realized using 1263 sites for 16S rRNA and 273 sites for *aprA*. For 16S rRNA (Fig. 1), two free-living marine gamma-proteobacteria were used as outgroup. We observe that 3 different bacterial species (16S rRNA identity inferior to 97%) occur within Lucinidae (Fig. 1, clades A and B and symbiont of *L.pectinata*). This tree permits to place symbionts sequences of Philippines clams in a monophyletic clade which correspond to "Lucinoidea symbionts". According to this tree and based on pairwise identity matrix (Table 3), it seems that all symbionts analyzed here belong to the same bacterial species (Fig.1, clade B) 16S rRNA identity being superior to 97% (97.7%). Moreover within this defined species we can distinguish two different bacterial types harbored by Philippines clams. The first one is shared by OG18, OG98 and OG108 and seem correspond exactly to the same bacterial type (mean 16S rRNA sequence identity of 99.9%) and the second one is present in OG57, OG101 and OG103 (98.6%). Thus, our 6 Philippines lucinid clams seem share 2 different variants of the same bacterial species. Sulfur-oxidizing metabolism of these symbionts harbored by Philippines clams is confirmed by the positive detection by PCR of

this gene. According to APS Reductase phylogenetic tree (Fig. 2) these symbiont sequences fall in the lineage II of *aprA* in the sulfur-oxidizing bacteria clade. Unfortunately tissues conservation not permits obtaining of *aprA* sequence for the specimen OG103.

Host Phylogeny

For all amplifications, only one fragment of the expected size was obtained for 18S rRNA and 28S rRNA (~1000bp and ~700bp respectively). These fragments gave unique sequences by sample analyzed. We use as outgroup, Thyasiroidea and Crassatelloidea which were sister-groups of Lucinidae. Host phylogeny realized with concatenation of sequences of these two genes using 1252 sites (Fig. 3) permits to place these samples in the Lucinidae clades described by Williams *et al.* (2003). Except for clade A, samples analyzed here were distributed in all diverse described clades. So, OG108 correspond to Myrtea species, OG101 to the clade B and finally OG98 and OG57 belong to the Anodontia clade. For OG18, 18S rRNA has not been obtained, nevertheless 28S rRNA sequence of this specimen fall in Clade B of a 28S rRNA tree (data not shown). No sequences have been obtained for OG103. For *C. orbicularis* and *L. pectinata*, sequences obtained here correspond to those published by Williams *et al.*, (2003)

Host/Symbiont phylogenies comparison

Comparing host and symbiont phylogenies they appear totally incongruent, topologies (*i.e.* branching order) and time of splitting events (*i.e.* branch length) being different. Thus, closer relative host species do not harbor close relative (or same) bacterial type (*e.g.* case of OG98 and OG57). Moreover, OG57 and OG101 which are different host species seem harboring the same bacterial type. More interestingly, the 3 host species which harbor the same bacterial strain (OG18, OG98 and OG108) belong to 3 different host lineages (clade B, Anodontia clade and Myrtea clade respectively). So it appears that there is no species specific association within Lucinidae.

Special features on ctenidial cells of the Philippines lucinids analyzed.

All analyzed individuals present ctenidial characteristics common within Lucinidae like described by Frenkiel & Mouëza (1995). However, two individuals have displayed some particularities. In OG18, bacteriocytes contained numerous dark granules inside the cytoplasm (Fig.x) that probably are pigments but whose nature is unknown. In OG103, the dark aspect of the cytoplasm with finely granular electron-dense areas suggests that intracellular hemoglobin is present inside bacteriocytes. This was confirmed by PEELS analysis in which iron was successfully detected in the cytoplasm of each bacteriocyte tested with a specific iron spectrum (edge closed to 730 eV) obtained after background subtraction (Fig. xx). The ESI method was also performed in order to image the location of the iron in the bacteriocyte's cytoplasm. When the Fe-distribution image was superimposed onto the high-contrast image (HCI) recorded at 250 eV (Mixmap image, Fig. xxx), iron was observed localized inside the cytoplasm of the bacteriocyte while bacteria remain free of iron (Fig. xxx). So, iron is present and distributed homogeneously within the cytoplasm of bacteriocytes. The presence of sulfur in the same area analyzed was tested by the PEELS method and no significant signal was obtained (data not shown).

Ultrastructure of the bacterial gill-endosymbionts of Philippines clams.

Bacteria are individually enclosed within vacuoles. These endosymbionts are rod-shaped with the characteristic double membrane of gram negative bacteria belonging to the γ -proteobacteria. In OG57 and OG101 bacteria are large (4 μ m long x 1.5 μ m large), in OG18 they are longer and thinner (6 μ m long x 0.5 μ m large) and in OG98 and OG103 the two categories are retrieved. In all cases bacteria can be big or small. Some ovoid shaped figures can be observed but are probably due to the section orientation. Symbionts are generally abundant per bacteriocyte excepted in OG103. Bacterial cytoplasm contains numerous non-membrane-bound irregular inclusions (up to 50nm in diameter) appearing as black dots in TEM sections that can be considered as polyhydroxybutyrate storage granules. Electron lucent granules (sulfur granules) are not obvious in these gill-endosymbionts contrary to bacterial symbionts encountered in the gills of tropical shallow water lucinids as *C. orbicularis* (Lechaire *et al.*, 2008).

Discussion

To date, diversity of host and symbiont within Lucinidae was investigated in studies with antagonist conclusions. Thus, in Distel *et al* (1988; 1994) species-specific associations has been shown being due to coevolution of the two partners. Later, associations between 6 host species and only one bacterial species was described attesting of an association more constituted in function of the bacteria present in the environment (Durand & Gros, 1996; Durand *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2003). Nevertheless in these studies molecular phylogeny of hosts has not been realized in comparison to symbionts one. In this paper, we aim to study diversity of hosts and symbionts in order to bring a better understanding of specificity of associations in this particular relationship realizing comparison of host and symbiont molecular phylogenies.

Host/Symbiont couples relationship evolution.

We analyzed diversity of host using 18SrRNA and 28SrRNA sequences. Specimens from Philippines analyzed here, belong to the Lucinidae monophyletic group (Fig. 3) as described in Williams *et al.* (2003). Like in all lucinids described to date, Philippines clams harbor symbiotic bacteria into their gills. According to 16S rRNA phylogeny these symbionts belong to a well supported monophyletic clade formed by already described Lucinoidea symbionts (Fig. 1). Moreover, PCR detection in our specimens of APS Reductase gene permits to attest that these symbionts possess sulfur-oxidizing pathway even if sulfur or sulfur granules has not been detected on gill sections by microscopy analyses. Concerning diversity of symbionts analyzed in this study, it seems that they belong to the same bacterial species (Fig. 1, clade C). This point is confirmed by sequence identity matrix showing that mean 16S rRNA sequence identity is superior to 97% in this clade. Thus, as described in Durand & Gros (1996), different host species could harbor the same bacteria. So, this result can not support the hypothesis that within Lucinidae, the associations are species-specific due to coevolution of the two partners. Thus, within Lucinidae, it seems to us that according to the acquisition mode of the symbiont (*i.e.* acquisition from a free-living bacteria present in the surroundings), the association takes place in function of the bacterial species present in the environment. Thereby, the specificity of association described in Distel *et al.* (1988; 1994) could be due to the heterogeneity of the sampling, ecosystems and geographic locations being very different

mimic specific associations. However how explain that within Lucinidae, so geographical diverse hosts could harbor a unique bacterial species? In fact, our specimens provide from Philippines, other like *Lucinoma aff. kazanii*, *Lucina floridana*, *Lucinoma aequizonata* or *C. orbicularis* provide from various geographic locations (respectively Mediterranean sea, Florida, California and Caraibe Distel *et al.*, 1994; Durand & Gros, 1996; Duperron *et al.*, 2007). Two hypotheses could explain this low level of genetic diversity between these symbionts: (i) geographic divergence of symbiotic populations too recent to permit observation of genetic divergence, (ii) low evolution rate of the consider marker (16S rRNA). Finally we privilege the second hypothesis because Peek *et al.* (1998a) described 16S rRNA sequences of environmentally acquired symbionts (as is the case for lucinid symbionts) evolve more slowly than vertically transmitted symbionts due to lack of bottleneck during passage from generation to generation in associations without vertical transmitted symbionts.

How bacterial species occur within Lucinidae?

Even if, it appears that there is no species-specific association within Lucinidae, there is more than one bacterial species associated with Lucinidae. The majority bacterial species belong to the clade B (Fig. 1) but we can also observe 2 other species harbored respectively by *Lucina pectinata* and by host species which belong to the anodontia clade except *A. alba* (Fig. 1, clade A). Interestingly, these bacterial species seem correspond to symbionts present in hosts which inhabit high sulfide environments (*e.g.* mangrove swamps) in comparison with shallow water sea-grass beds or reducing sediments. This distinction between this different bacterial species supposes that bacterial species could be different according to sulfur level of different habitats. So this point reinforce the fact that lucinid clams do not co-evolved strictly with their symbiont but rather be associated with the symbiosis-competent bacteria present in their environment.

Does multi-infection occur within Lucinidae?

However, in the unique bacterial species observed in Philippine clams (Fig. 1 Clade B), according to symbiont phylogeny we can distinguish 2 different groups (Fig. 1, groups I and II). These two groups seem correspond to the two bacterial morphotypes viewed in TEM analysis. Thus, the large morphotype (observed in OG57 and OG101) corresponds to the group I and the longer and thinner one (observed in OG18) corresponds to the group II. Interestingly, for OG98 and OG103 only one bacterial sequence was detected even if the two morphotypes are present in their gills. So, in these specimens multi-infection of two different bacterial types could occur and could be not detected due to the technique employed here which permit only visualization of the majority sequence (*i.e.* PCR direct sequencing). A more concerted effort concerning these two lucinids (OG98 and OG103) including the analysis of a 16S rDNA clone library issued from gill DNA and fluorescent in situ hybridization analysis of the symbionts will be necessary to confirm the hypothesis of dual symbiosis in such lucinid. Nevertheless, recently, a multiple symbiosis partnership was suspected in the lucinid *A. ovum* according to TEM observations but the authors failed to confirm these ultrastructural observations by molecular data as only a single 16S rDNA sequence was obtained from 62 clones analyzed (Ball *et al.*, 2009). However, the presence for a same morphotype of both small and big bacterial inside a same bacteriocyte could be related to the DNA content of new phagocytosed symbionts and old ones. Recently, Caro *et al.* (2007) have shown using single-cell approaches including flow cytometry (FCM) that the sulfur-oxidizing gill endosymbiont population of *C. orbicularis* was heterogeneous ranging from one copy of their genome for the smaller cells to more than four copies for the larger cells and even up to 20 copies when the host was kept in starvation. This multiplication of the

genomic DNA content while cell division is forbidden by the host could explain the heterogeneous size of a single bacterial species inside a same bacteriocyte. Thus, recently recruited symbionts (the small bacterial symbionts) are located near the apical pole and abundantly supplied with growth substrates by the host, while their division is inhibited. As new symbionts are recruited, the older ones migrate toward the basal pole becoming larger with the increase of their genome.

Hemoglobin, sulfur and symbiosis

According to TEM analysis, there is no evidence of sulfur granules in gill-endosymbionts of lucinids from Philippines conversely to those described for example in symbionts of *C. orbicularis* (Lechaire *et al.*, 2008). This is surprising because these symbionts are sulfur-oxidizing as attest the detection of APS Reductase gene. Nevertheless, no hypothesis could explain this particularity. Another interesting feature concerns the specimen *Myrtea flabelliformis* (OG103) which present a dark cytoplasm and low number of gill-endosymbionts. The dark aspect of bacteriocytes cytoplasm suggests the presence of hemoglobin in gill tissues of this host which has been confirmed by PEELS and ESI analyses. Hemoglobin, which is an oxygen or hydrogen sulfide transporter (Kraus, 1993) is scarce within Lucinidae even if it has been described in gill tissues of some species like *Anodontia edentulata* (Lebata, 2001), *L. pectinata* (Kraus & Wittenberg, 1990; Gavira *et al.*, 2008) or *Myrtea spinifera* (Dando *et al.*, 1985) and suggested in *Anodontia ovum* (Ball *et al.*, 2009). It has been proposed in the literature that hemoglobin contribute to detoxification against sulfur (which is toxic for respiratory chain and could harm tissues) in high sulfide environments as hydrothermal vents (Arndt *et al.*, 2001). This role of hemoglobin in detoxification has also been suggested for the shallow water Lucinidae *L. pectinata* conjugated with the presence of sulfide oxidizing bodies (Liberge *et al.*, 2001). However, sulfur level environment of our *M. flabelliformis* specimen is unknown. In addition, hemoglobin has also been described in another species of the genus *Myrtea* (*M. spinifera*) which inhabit low sulfide environment (Dando *et al.*, 1985). Finally, there is no evidence of sulfur-oxidizing bodies in gill sections of *M. flabelliformis*. Thus, detoxification role of hemoglobin against sulfur could not be clearly attested for this specimen. Which other hypothesis could be posed to explain the high hemoglobin concentration in cytoplasm of *M. flabelliformis*? According to Dando *et al.*, (1985) high affinity of hemoglobin for oxygen could give some evidence of its role. Indeed, hemoglobin could act as oxygen storage during burrowing or protects sulfur-oxidizing endosymbionts against excess of oxygen, sulfur-oxidizing bacteria being frequently microaerophile (Jorgensen, 1982). However, in our case there is no evidence which permit to distinguish between these two hypotheses.

According to our results on the 6 Lucinidae species from Philippines compared to literature data, it appears obviously that Lucinidae and their symbionts have not co-evolved from an ancestral symbiosis. In fact, the association seems to be more constituted in function of the bacterial type present in the environment. Moreover, according to 16S rRNA Lucinidae appear to be associated in majority to a same bacterial sulfur-oxidizing species. Particularly cases corresponding to bacterial species associated to hosts which inhabit high sulfur environments (*A. ovum*, *A. phillipiana* and *L. pectinata*).

Acknowledgments

The material from the Philippines was obtained during the PANGLAO 2005 deep-sea cruise aboard M/V DA-BFAR and we thank Dr P. Bouchet and L. Labe, the co-principal investigators, for their invitation. Our participation was made possible from a MNHN grant under the program "Status and Phylogenetic Structure of Recent and Fossil Biodiversity" led by Dr P. Janvier. Labwork was performed within the framework of the DIWOOD project. We thank Dominique Higuet for their fruitful comments and Denis Poinot for English revision. T.B. is funded as a PhD student by a MENRT (Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Technologies) grant.

References

- Arndt C, Gaill F & Felbeck H (2001) Anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. *J Exp Biol* **204**: 741-750.
- Ball DJ, Purdy KJ, Glover EA & Taylor JD (2009) Ctenidial structure and three bacterial symbiont morphotypes in *Anodontia* (Euanodontia) *ovum* (REEVE, 1850) from the great barrier reef, AUSTRALIA (Bivalvia: Lucinidae). *J molluscan Stud* (in press).
- Berg CJJ & Alatalo P (1984) Potential of chemosynthesis in molluscan mariculture. *Aquaculture* **39**: 165-179.
- Boss KJ (1970) *Fimbria* and its lucinoid affinities (Mollusca; Bivalvia). *Breviora* **350**: 1-16.
- Caro A, Gros O, Got P, De Wit R & Troussellier M (2007) Characterization of the population of the sulfur-oxidizing symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by single-cell analyses. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2101-2109.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-552.
- Dando PR, Southward AJ, Southward EC, Terwilliger NB & Terwilliger RC (1985) Sulfur-oxidizing bacteria and hemoglobin in gills of the bivalve mollusk *Myrtea spinifera*. *Marine Ecology-Progress Series* **23**: 85-98.
- Deming JW, Reysenbach AL, Macko SA & Smith CR (1997) Evidence for the microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor: bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. *Microsc Res Tech* **37**: 162-170.
- Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, McCracken VJ, Aminov R, Mackie RI & Gaskins HR (2000) Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2166-2174.
- Distel DL, Felbeck H & Cavanaugh CM (1994) Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbiont and their Bivalve hosts. *J Mol Evol* **38**: 533-542.
- 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.
- Dubilier N, Bergin C & Lott C (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* **6**: 725-740.
- Duperron S, Fiala-Medioni A, Caprais JC, Olu K & Sibuet M (2007) Evidence for chemoautotrophic symbiosis in a Mediterranean cold seep clam (Bivalvia: Lucinidae): comparative sequence analysis of bacterial 16S rRNA, APS reductase and RubisCO genes. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 64-70.
- Durand P & Gros O (1996) Bacterial host specificity of Lucinacea endosymbionts: interspecific variation in 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* **140**: 193-198.

- Durand P, Gros O, Frenkiel L & Prieur D (1996) Phylogenetic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three tropical Lucinidae by 16S rDNA sequence analysis. *Mol Mar Biol Biotechnol* **5**: 37-42.
- Felbeck H, Childress JJ & Somero GN (1981) Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* **293**: 291-293.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Fisher CR (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev. Aquat. Sci* **2**: 399-613.
- Frenkiel L & Mouëza M (1995) Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Zoomorphology* **115**: 51-61.
- Gavira JA, Camara-Artigas A, De Jesus-Bonilla W, Lopez-Garriga J, Lewis A, Pietri R, *et al.* (2008) Structure and ligand selection of hemoglobin II from *Lucina pectinata*. *J Biol Chem* **283**: 9414-9423.
- Gros O & Gaill F (2007) Extracellular bacterial association in gills of "wood mussels". *Cahiers De Biologie Marine* **48**: 103-109.
- Gros O, Frenkiel L & Felbeck H (2000) Sulfur-oxidizing endosymbiosis in *Divaricella quadrisulcata* (Bivalvia: Lucinidae): Morphological, ultrastructural, and phylogenetic analysis. *Symbiosis* **29**: 293-317.
- Gros O, Liberge M & Felbeck H (2003) Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Mar Biol* **142**: 57-66.
- Guindon S & Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704.
- Ishaq M, Wolf B & Ritter C (1990) Large-scale isolation of plasmid DNA using cetyltrimethylammonium bromide. *Biotechniques* **9**: 19-20, 22, 24.
- Jeanguillaume C, Trebbia P & Colliex C (1978) About the use of electron energy-loss spectroscopy for chemical mapping of thin foils with high spatial resolution. *Ultramicroscopy* **3**: 237-242.
- Jorgensen BB (1982) Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **298**: 543-561.
- Juniper SK & Sibuet M (1987) Cold seep benthic communities in Japan subduction zones: spatial organization, trophic strategies and evidence for temporal evolution. *Mar Ecol Prog Ser* **40**: 115-126.
- Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ & McLnerney JO (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* **6**: 29.
- Kraus DW (1993) Heme-proteins in sulfide-oxidizing bacteria mollusk symbioses. 112-120. Amer Soc Z. Los Angeles, Ca.
- Kraus DW & Wittenberg JB (1990) Hemoglobins of the *Lucina pectinata*/bacteria symbiosis. I. Molecular properties, kinetics and equilibria of reactions with ligands. *J Biol Chem* **265**: 16043-16053.
- Lane DJ (1991) 16S/23S Sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons., pp. 115-175. New York.
- Lebata MJ (2001) Oxygen, sulphide and nutrient uptake of the mangrove mud clam *Anodontia edentula* (Family: Lucinidae). *Mar Pollut Bull* **42**: 1133-1138.
- Lechaire J-P, Freibourg G, Gaill F & Gros O (2008) In situ characterization of sulfur in gill-endosymbionts of the shallow water lucinid *Codakia orbicularis* (Linné, 1758) by cryo-EFTEM microanalysis. *Mar Biol* **154**: 693-700.

- Liberge M, Gros O & Frenkiel L (2001) Lysosomes and sulfide-oxidizing bodies in the bacteriocytes of *Lucina pectinata*, a cytochemical and microanalysis approach. *Mar Biol* **139**: 401-409.
- Milne I, Wright F, Rowe G, Marshall DF, Husmeier D & McGuire G (2004) TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* **20**: 1806-1807.
- Newell ND (1969) Classification of Bivalvia. In: *Treatise on invertebrates paleontology*. The Geological Society of America and the University of Kansas, Vol. 1 pp. N205-N224.
- Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA & Littlewood DT (2003) Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int J Parasitol* **33**: 733-755.
- Peek AS, Vrijenhoek RC & Gaut BS (1998a) Accelerated evolutionary rate in sulfur-oxidizing endosymbiotic bacteria associated with the mode of symbiont transmission. *Mol Biol Evol* **15**: 1514-1523.
- Peek AS, Feldman RA, Lutz RA & Vrijenhoek RC (1998b) Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9962-9966.
- Reid RGB (1990) Evolutionary implications of sulphide-oxidising symbioses in bivalves. In: Morton, B. (ed.) *The Bivalvia — Proceedings of a Memorial Symposium in Honour of Sir Charles Maruice Yonge, Edinburgh, 1986 Hong Kong University Press*. 127-140.
- Reimer L, Rennekamp R, Fromm I & Langenfeld M (1991) Contrast in the electron spectroscopic imaging mode of a TEM. IV. Thick specimens imaged by the most-probable energy loss. *J Microsc* **162**: 3-14.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Schwarz G (1978) Estimating the Dimension of a Model. *Ann. Statist.* **6**: 461-464.
- Schweimanns M & Felbeck H (1985) Significance of the occurrence of chemoautotrophic bacterial endosymbionts in lucinid clams from Bermuda. *Mar Ecol Prog Ser* **24**: 113-120.
- Taylor JD & Glover EA (2005) Lucinidae (Bivalvia) – the most diverse group of chemosymbiotic molluscs. *Zool J Linnean Society* **148**.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Williams ST, Taylor JD & Glover EA (2003) Molecular Phylogeny of the Lucinoidea (Bivalvia): Non-Monophyly and Separate Acquisition of Bacterial Chemosymbiosis. *J Molluscan Stud* **70**: 187-202.
- Winnepenninckx BM, Reid DG & Backeljau T (1998) Performance of 18S rRNA in littorinid phylogeny (Gastropoda: Caenogastropoda). *J Mol Evol* **47**: 586-596.

Title and legends to figures

Figure 1. Symbionts phylogenetic tree realized using 16S rRNA sequences (1269 bp).

Tree was reconstructed using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) under K80+I+ Γ evolutionary models. Robustness of clades was evaluated and only bootstrap values (ML, 100 replicates [above branches]) and posterior probabilities (BI [under branches]) up to 80% were displayed. Taxa in bold provide from this study.

Figure 2. Symbionts phylogenetic tree realized using *aprA* sequences (273 bp).

Tree was reconstructed using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) under TrNef+ Γ (ML) and K80+ Γ (BI) evolutionary models. Robustness of clades was evaluated and only bootstrap values (ML, 100 replicates [above branches]) and posterior probabilities (BI [under branches]) up to 70% were displayed. Taxa in bold provide from this study.

Figure 3. Hosts phylogenetic tree realized using contatenation of 18S rRNA and 28S rRNA sequences (1252 bp).

Tree was reconstructed using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) under TrNef+ Γ (ML) and SYM+ Γ (BI) evolutionary models. Robustness of clades was evaluated and only bootstrap values (ML, 100 replicates [above branches]) and posterior probabilities (BI [under branches]) up to 80% were displayed. Taxa in bold provide from this study and all other sequences provide from (Williams *et al.*, 2003). ^aSequences obtained for these two species correspond to those published by Williams *et al.* (2003).

Figure 4.

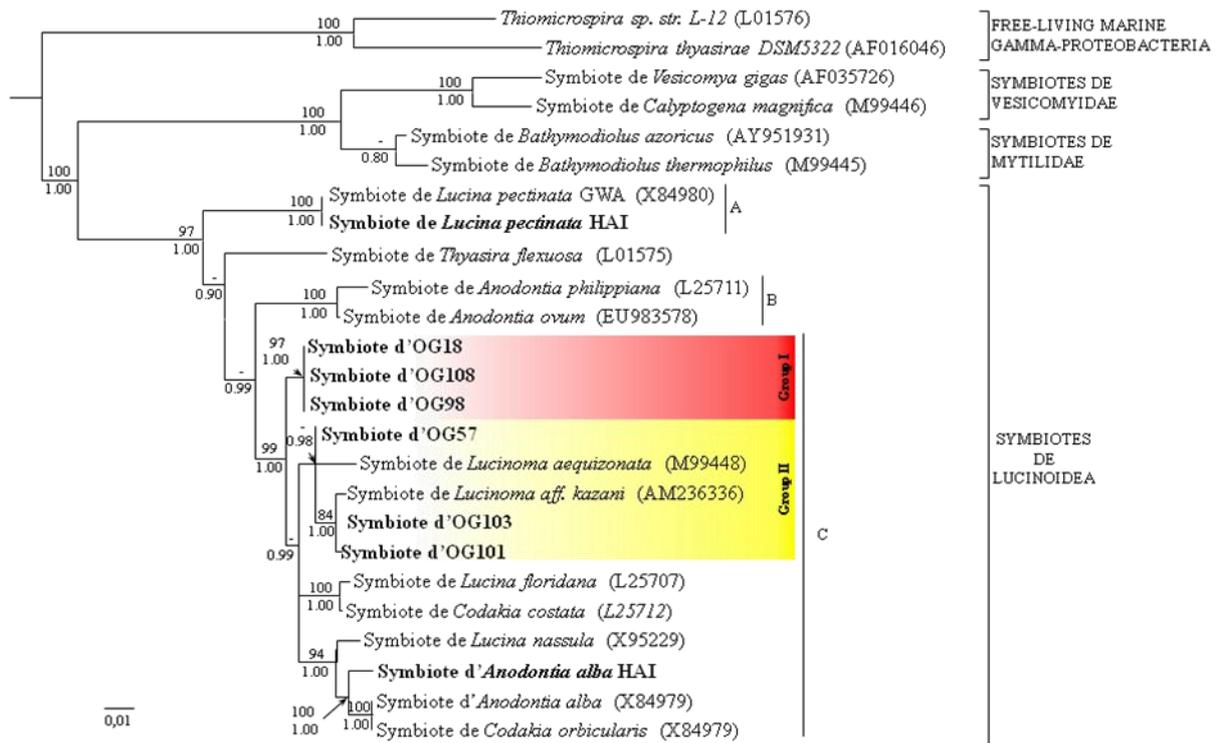


Figure 1. Symbionts phylogenetic tree realized using 16S rRNA sequences (1269 bp).

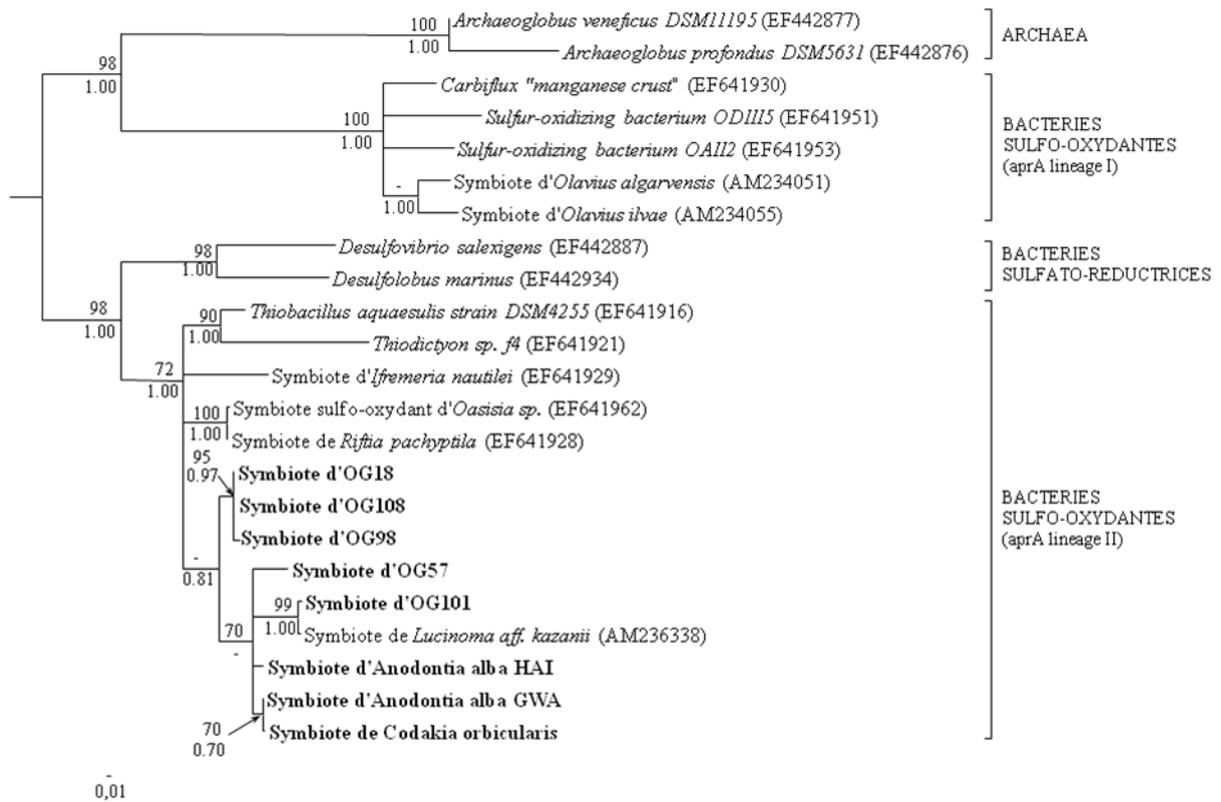


Figure 2. Symbionts phylogenetic tree realized using *aprA* sequences (273 bp).

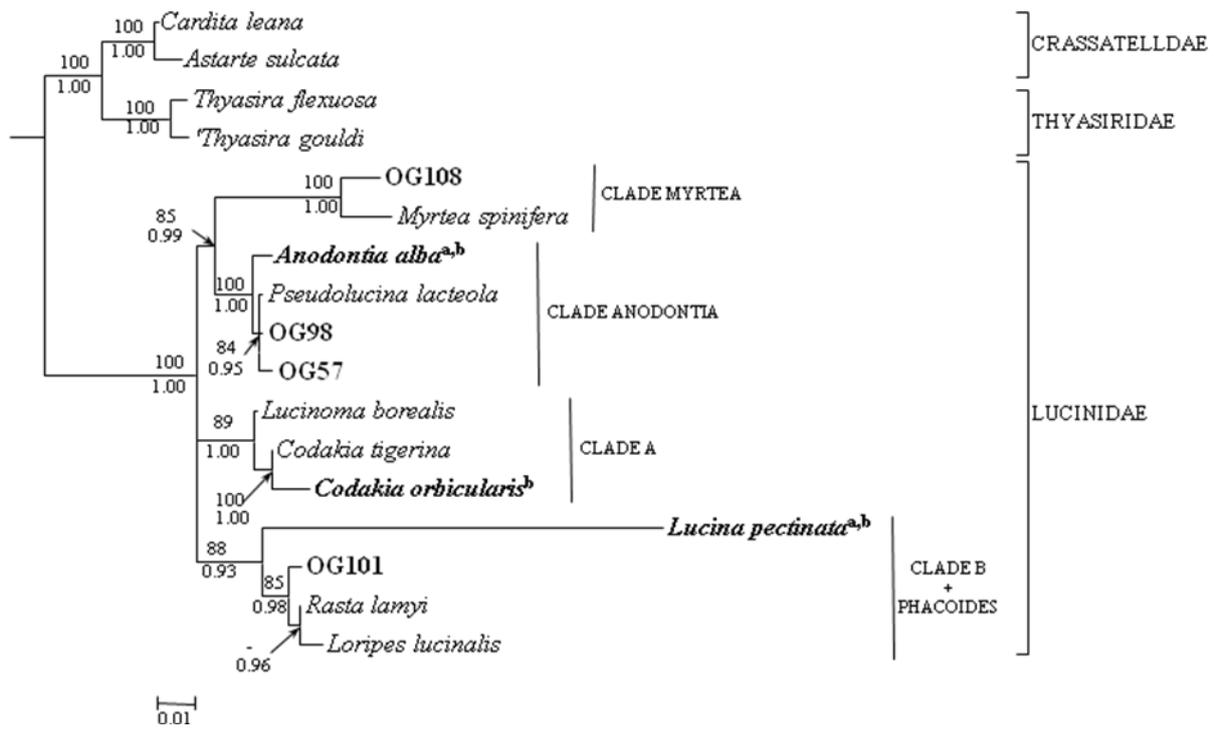


Figure 3. Hosts phylogenetic tree realized using contatenation of 18S rRNA and 28S rRNA sequences (1252 bp).

Tables

Table 1. Sampling of Philippines clams from PANGLAO 2005 cruise.

Specimen code	Species ^a	Sampling site	Location	Station	Depth (m)	Accession numbers ^b			
						16S rRNA	APS reductase	18S rRNA	28S rRNA
OG 18	-	Bohol Sea Off Balicasag island	9°29.4' N 123°43.7'E	CP 2340	271 - 318	To be submitted	To be submitted	-	To be submitted
OG 57	-	Bohol Sea	9°24.3' N 124°10.7'E	CP 2355	176 - 177 5	To be submitted	To be submitted	To be submitted	To be submitted
OG 98	<i>Gloverina sp.</i>	Bohol/Sulu seas sill	8°49.9' N 123°37.6'E	CP 2360	357 - 372	To be submitted	To be submitted	To be submitted	To be submitted
OG 101	<i>Cardiolina quadrata</i>	Bohol Sea	9°26.9' N 123°34.5'E	CP 2388	762 - 786	To be submitted	To be submitted	To be submitted	To be submitted
OG 103	<i>Myrtea flabelliformis</i>	Bohol Sea	9°26.9' N 123°34.5'E	CP 2388	762 - 786	To be submitted	-	-	-
OG 108 ^c	-	Bohol Sea	9°27.4' N 123°43.1'E	CP 2390	627 - 645	To be submitted	To be submitted	To be submitted	To be submitted

^a Species determination was realized by John D. Taylor (NHM, UK) based on morphological characters.

^b Due to tissue conservation some sequences has not been obtained for some individuals.

^c Microscopy analysis could not be realized for OG 108 specimen.

Table 2. Primers and PCR conditions.

	Sequence (5'> 3')	Tm	Name	Target	Reference
Symbiont	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	54°C	16S_UNIV-8f	16S rRNA	(Lane, 1991)
	TACGGCTACCTTGTTACGACT		16S_UNIV-1492r		
	TGGCAGATMATGATYMACGGG	58°C	APS-FW	APS reductase	(Deplancke <i>et al.</i> , 2000)
	GGGCCGTAACCGTCCTTGAA		APS-RV		
Host	CCGTCTTGAAACACGGACCAAG	52°C	LSU-900f	28S rRNA (Large subunit)	(Olson <i>et al.</i> , 2003)
	AGCGCCATCCATTTTCAGG		LSU-1600r		(Williams <i>et al.</i> , 2003)
	CTGGTTGATYCTGCCAGT	54°C	18S-5'F	18S rRNA	(Winnepenninckx <i>et al.</i> , 1998)
	CTTCGAACCTCTGACTTTGG		18S-1100R		(Williams <i>et al.</i> , 2003)

Table 3. 16S rRNA sequences identity matrix (pairwise deletion)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>1: Codakia orbicularis</i> symbiont	ID																
<i>2: Anodontia alba</i> symbiont	1,000	ID															
<i>3: Lucina nassula</i> symbiont	0,984	0,984	ID														
<i>4: Codakia costata</i> symbiont	0,975	0,975	0,979	ID													
<i>5: Lucina floridana</i> symbiont	0,971	0,971	0,981	0,996	ID												
<i>6: OG57</i> symbiont	0,966	0,966	0,971	0,976	0,978	ID											
<i>7: OG101</i> symbiont	0,970	0,970	0,973	0,982	0,980	0,985	ID										
<i>8: OG103</i> symbiont	0,970	0,970	0,973	0,978	0,978	0,980	0,993	ID									
<i>9: Lucinoma aff. kazani</i> symbiont	0,969	0,969	0,973	0,981	0,978	0,982	0,994	0,990	ID								
<i>10: Lucinoma aequizonata</i> symbiont	0,960	0,960	0,963	0,968	0,966	0,981	0,976	0,973	0,974	ID							
<i>11: OG18</i> symbiont	0,977	0,977	0,978	0,979	0,976	0,988	0,981	0,984	0,977	0,969	ID						
<i>12: OG98</i> symbiont	0,971	0,971	0,972	0,973	0,972	0,985	0,978	0,978	0,973	0,968	0,999	ID					
<i>13: OG108</i> symbiont	0,969	0,969	0,970	0,971	0,972	0,986	0,976	0,976	0,971	0,969	0,999	0,999	ID				
<i>14: Anodontia ovum</i> symbiont	0,951	0,951	0,959	0,957	0,959	0,952	0,953	0,952	0,951	0,944	0,960	0,955	0,953	ID			
<i>15: Anodontia phillipiana</i> symbiont	0,947	0,947	0,955	0,949	0,951	0,946	0,947	0,946	0,946	0,938	0,954	0,949	0,946	0,990	ID		
<i>16: Thyasira flexuosa</i> symbiont	0,942	0,942	0,944	0,945	0,942	0,941	0,941	0,939	0,940	0,933	0,950	0,944	0,942	0,947	0,945	ID	
<i>17: Lucina pectinata</i> symbiont	0,947	0,947	0,949	0,941	0,939	0,933	0,933	0,932	0,933	0,926	0,941	0,936	0,934	0,945	0,943	0,941	ID