

THESE  
Présentée devant  
L'Université des Antilles et de la Guyane

Pour l'obtention du  
Diplôme de DOCTORAT

Par  
**Nathalie H. ELISABETH**

**PLASTICITE TISSULAIRE ET CELLULAIRE DU  
FILAMENT BRANCHIAL DES LUCINIDAE  
SYMBIOTIQUES COTIERS *CODAKIA  
ORBICULATA ET LUCINA PENNSYLVANICA***

Soutenue le 24 octobre 2011 devant le jury composé de :

Mme DUFOUR Suzanne, Docteur HDR - Memorial University of Newfoundland  
M GROS Olivier, Professeur - Université Antilles Guyane  
Mme GUSTAVE-DIT-DUFLO Sylvie, Docteur – Université Antilles Guyane  
Mme PAILLARD Christine, Docteur HDR – CNRS  
M ROMANA Marc, Docteur HDR – INSERM

Rapporteur  
Directeur  
Encadrante  
Rapporteur  
Examineur





**THESE**  
Présentée devant  
**L'Université des Antilles et de la Guyane**

Pour l'obtention du  
Diplôme de DOCTORAT  
(Spécialité Biologie des Organismes)

Par  
**Nathalie H. ELISABETH**

**PLASTICITÉ TISSULAIRE ET CELLULAIRE DU  
FILAMENT BRANCHIAL DES LUCINIDAE  
SYMBIOTIQUES CÔTIERS *CODAKIA  
ORBICULATA ET LUCINA PENNSYLVANICA***

**Composition du jury :**

Mme DUFOUR Suzanne, Docteur HDR - Memorial University of Newfoundland  
M GROS Olivier, Professeur - Université Antilles Guyane  
Mme GUSTAVE-DIT-DUFLO Sylvie, Docteur – Université Antilles Guyane  
Mme PAILLARD Christine, Docteur HDR – CNRS  
M ROMANA Marc, Docteur HDR – INSERM

Rapporteur  
Directeur  
Encadrante  
Rapporteur  
Examineur



## **PLASTICITE TISSULAIRE ET CELLULAIRE DU FILAMENT BRANCHIAL DES LUCINIDAE SYMBIOTIQUES COTIERS *CODAKIA ORBICULATA* ET *LUCINA PENNSYLVANICA*.**

La zone latérale des filaments branchiaux des espèces de bivalves littoraux *Codakia orbiculata* et *Lucina pensylvanica* est le lieu d'une symbiose chimioautotrophe avec des bactéries sulfo-oxydantes hébergées dans des cellules spécialisées, appelées bactériocytes. L'équilibre existant entre les bactériocytes et les autres types cellulaires du filament branchial peut être fortement perturbé en fonction de la quantité de symbiotes présents dans la branchie. Dans le cadre de ce travail de thèse nous nous sommes proposés de déterminer les mécanismes qui sous-tendent la plasticité cellulaire et tissulaire observée, au sein de la zone latérale des filaments branchiaux, au cours des processus de décolonisation et de recolonisation bactérienne. Pour ce faire, des individus collectés dans leur milieu naturel, ont été maintenus au laboratoire dans des bacs d'eau de mer filtrée en absence de nourriture et de soufre réduit, afin de provoquer la décolonisation bactérienne des filaments branchiaux. Lorsque la branchie apparaissait purgée de ses symbiotes, les individus ont été remis dans leur habitat naturel afin de provoquer la recolonisation de la branchie. L'analyse des branchies au cours de ces processus a fait appel à des techniques variées (histologie, immunohistochimie, hybridation *in situ*, cytométrie en flux, dosage des protéines totales, dosages des protéines soufrées et spectrométrie de fluorescence X). Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'acquisition environnementale mise en évidence chez les juvéniles des *Codakia* se poursuivait tout au long du cycle de vie des adultes. Cette étude a également permis une meilleure compréhension des mécanismes tissulaires sous-jacents à la plasticité du filament branchial en mettant en évidence les processus d'apoptose et de prolifération cellulaire qui ont lieu au cours des processus de décolonisation et de recolonisation. En effet, nous avons montré que le renouvellement des cellules hôtes de la branchie peut se faire à la fois par multiplication de bactériocytes existants et par différenciation de cellules a priori indifférenciées, retrouvées au niveau des ponts tissulaires de la branchie. Nos résultats montrent également que les phénomènes de décolonisation et de recolonisation bactériennes du filament branchial s'accompagnent d'une variation de la teneur en soufre élémentaire, ainsi que de la taille relative et du contenu génomique des symbiotes. Il serait intéressant de poursuivre ce travail par la recherche d'indices de la digestion enzymatique des symbiotes au cours de la décolonisation ainsi que la par la mise en évidence des processus de reconnaissance hôte-symbiote indispensables à l'initiation de l'association.

**Mots-clés :** acquisition des symbiotes, actine, apoptose, bactéries sulfo-oxydantes, herbier à *Thalassia testudinum*, histologie, hybridation *in situ*, immunohistochimie, prolifération cellulaire, symbiose chimiosynthétique.

## **TISSUE AND CELL PLASTICITY OF GILL FILAMENTS OF COASTAL SYMBIOTIC LUCINIDAE *CODAKIA ORBICULATA* AND *LUCINA PENNSYLVANICA*.**

The lateral zone of gills filaments of coastal bivalves *Codakia orbiculata* and *Lucina pensylvanica* is the site of chemoautotrophic symbiosis with sulfur-oxidizing bacteria, housed in specialized cells called bacteriocytes. The balance between bacteriocytes and the others cell types in the gill filament may be disrupted depending on the level of these symbionts in the gill. The objective of this thesis is to determine the mechanisms underlying cell plasticity and tissue plasticity observed in the lateral zone of gills filaments during the processes of bacterial decolonization and recolonization. In order to do this, the individuals collected in their natural habitat were maintained at the laboratory in seawater filtered tanks, without food and reduced sulfur, to cause bacterial decolonization. When the gills seemed to be purged, the individuals were returned to their natural habitat in order to cause the bacterial recolonization of gills filaments. The analysis of the gills during these processes involves several techniques (histology, immunohistochemistry, molecular hybridization, flow cytometry, total protein assays, protein sulfur assays, X-ray fluorescence spectrometry). This study shows that symbiont acquisition can occur during the entire life of *Codakia* bivalves. It also allows a better understanding of gills filaments plasticity by highlighting apoptosis and cell proliferation during decolonization and recolonization processes. Indeed, we showed that host cell renewal in gills can be done by bacteriocytes multiplication or by differentiation of a priori undifferentiated cells of tissular bridges. It should allow a better understanding of the biology of symbionts. It will be interesting to search for enzymatic digestion of symbionts during starvation and to investigate processes of host cell-symbiont recognition.

**Key-words :** actin, apoptosis, cell proliferation, chemosynthetic symbiosis, histology, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, symbionts acquisition, sulfur-oxydizing bacteria, *Thalassia testudinum*.



**Cette thèse a été préparée au sein de l'équipe  
"Biologie de la Mangrove" de l'U.M.R. 7138  
Systématique Adaptation et Évolution.**

Université des Antilles et de la Guyane  
U.F.R. des Sciences Exactes et Naturelles  
Département de Biologie  
B.P. 592  
97159 Pointe-à-Pitre cedex  
Guadeloupe  
France



## REMERCIEMENTS

*Au terme de ces trois années de thèse, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, à titre personnel ou professionnel, à la réalisation et au bon déroulement de cette thèse. C'est avec une émotion certaine que je rédige ces lignes et vous adresse mes sincères remerciements.*

*Selon Hyland (2004) La structure générale des remerciements d'un mémoire de thèse comprend une partie remerciements académiques suivie d'une partie visant à remercier les organismes financeurs, les soutiens techniques, avant de finir par les remerciements aux personnes qui ont apporté leur soutien moral à l'auteur.*

*Pour respecter la tradition je suivrai donc ce plan.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Olivier Gros pour la qualité de l'encadrement fourni. Son incroyable disponibilité, son dynamisme, ses qualités pédagogiques et sa rigueur (le tout mélangé à un peu de douceur c'eût été parfait) ont largement contribué à la réussite de ce travail de thèse. Je remercie également chaleureusement mon encadrante Sylvie Gustave-Dit-Dufflo pour m'avoir initiée à l'immunohistochimie. Je la remercie également pour l'optimisme dont elle a su faire preuve durant ces trois ans, ainsi que pour son soutien dans les démarches post-thèse.*

*Merci à Suzanne Dufour et Christine Paillard d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et de s'être déplacées ici, en Guadeloupe pour la soutenance. Merci également à Marc Romana d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse.*

*Je remercie également Abel Hiol, Hervé Le Guyader et Nathalie Niquil pour leur participation au comité de thèse.*

*J'adresse également mes sincères remerciements à toute l'équipe « Biologie de la Mangrove », au laboratoire de biologie marine, à l'équipe enseignante du département de biologie de l'UAG.*

*Je souhaite aussi remercier les différents collaborateurs avec qui j'ai pu travailler durant cette thèse. Merci à Audrey Caro et Patrice Got du Laboratoire Ecologie des Systèmes Marins Côtiers de l'UMR 5119 de l'Université Montpellier 2 pour les analyses de cytométrie en flux. Merci à Thierry Césaire et Jean-Louis Mansot du laboratoire GTSI (Groupe de Technologie des Surfaces et des Interfaces) de l'UAG. Enfin, merci à Marie-Noëlle Sylvestre et Patrick Jean-Louis pour les dosages de protéines.*

*Je remercie également Robert Hamparian et Sébastien Cordonnier pour les sorties à l'îlet Cochon, ainsi que Catherine Losio pour son soutien et sa bonne humeur. Je n'oublie pas de remercier Juanito Ledoux pour la collecte des échantillons de *Lucina pensylvanica* en Martinique.*

*Merci à George Louis pour sa bonne humeur.*

*J'adresse mes remerciements à la Région Martinique pour son soutien financier.*

*Je remercie Guilaine pour les nuits blanches passées à relire ce tapuscrit.*

*J'adresse mes plus chaleureux remerciements à mes amis et à ma famille pour leur immense soutien.*

*A mes amis de la fac, Amandine, Audrey<sup>2</sup>, Boris, Charlotte, Evo, Félix<sup>2</sup>, Florence, Gaëlle, Jean-Loup, Jean-Marie, Léa, Loïc, Leslie, Maïtena, Malik, Mélina, Nadège, Ney, Pedro, Pierre-Yves, Sandrine, Sébastien, Silvina, Sophie, Yann ainsi qu'aux amis moniteurs et membres de l'AJC, je dis un énorme merci. Une spéciale dédicace au club des doctorants en détresse (Président, n'oublie pas le Skype pour ta soutenance) et aux copines membres (Slim Sandrine, Slim Mélina et Slim Gaëlle vous allez me manquer).*

*Je remercie également mon amie Bélinda pour son soutien de longue date et pour la force dont elle fait preuve et qu'elle me transmet.*

*Une pensée à mes amis d'enfance que j'ai peu vu mais qui ont su m'apporter leur soutien lors de mes rares séjours en Martinique ou via les réseaux sociaux et le bon vieux téléphone. Merci à Aude, Aurélia, Hélène et Laurie (  Mwen pa sè'w, ou pa sè mwen, poutan mwen inmin'w konsa...). Merci à Manuel, mon pote de toujours.*

*Je remercie également ma famille pour m'avoir enseigné le courage, l'humilité, la persévérance et la rigueur. J'adresse des remerciements particuliers à ma mère pour avoir été à mes côtés de la maternelle au 24*

*octobre 2011, à mon père pour son soutien, à Louïs, à Gyl, à Gladys, à mes grands-mères, à mes tantes, à Céline. Soyez assurés de ma reconnaissance.*

*Je ne saurai finir sans remercier Jean-Marie pour son soutien inconditionnel durant ces sept années. Merci pour ton aide pendant la rédaction et la préparation de l'oral, tu m'as bien rendu la pareille (et même plus). Merci d'avoir eu la patience d'attendre un an la fin de ma thèse. Ca y est, l'aventure peut commencer !*

*An ka bout pawol la an kréyol pou di zot mèsí onpí.*



*À mes parents,*

*À Jean-Marie,*



# Table des matières

<b>Chapitre 1 : Les associations symbiotiques chimioautotrophes en milieu marin : cas des Lucinidae.....</b>	<b>1</b>
<b>1. La symbiose .....</b>	<b>3</b>
1.1. Les interactions durables.....	3
1.2. Caractéristiques de la symbiose .....	4
1.3. Les concepts de cellule et d'individu .....	9
<b>2. Les associations symbiotiques chimioautotrophes en milieu marin.....</b>	<b>10</b>
2.1. Historique et définitions.....	10
2.2. Ecosystèmes concernés.....	11
2.3. Adaptations aux milieux riches en sulfure d'hydrogène .....	16
<b>3. Les associations bivalves-bactéries chimioautotrophes.....</b>	<b>19</b>
3.1. Les bivalves symbiotiques autres que les Lucinidae.....	20
3.2. Les Lucinidae .....	23
<b>4. Objectifs de la thèse .....</b>	<b>31</b>
4.1. Objectif 1 : Mise en évidence de la plasticité tissulaire du filament branchial des Lucinidae et compréhension des mécanismes sous-jacents .....	31
4.2. Objectif 2 : Etude de l'acquisition des symbiotes.....	33
4.3. Objectif 3 Mise en évidence de la plasticité des symbiotes bactériens .....	33
<b>5. Organisation du manuscrit.....</b>	<b>34</b>
<b>Chapitre 2 : Etude de la plasticité tissulaire et cellulaire chez l'hôte.....</b>	<b>34</b>
<b>1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>37</b>
1.1. Matériel biologique .....	37
1.2. Collecte des échantillons.....	38
1.3. Conditions expérimentales.....	39
1.4. Incubation en BrdU .....	42
1.5. Préparation des échantillons.....	44
1.6. Techniques de détection de la prolifération cellulaire.....	46
1.7. Techniques de détection de l'apoptose : mort cellulaire.....	50
1.8. Protocole d'immunolocalisation de la caspase 3. ....	51
1.9. Techniques de détection des symbiotes .....	52

1.10.	Techniques de coloration histologique .....	54
1.11.	Observations .....	55
1.12.	Techniques de dosages des protéines.....	56
<b>2.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>59</b>
2.1.	Morphologie et structure de la branchie .....	59
2.2.	Organisation tissulaire du filament branchial de l'hôte en fonction de la présence ou de l'absence des symbiotes.....	65
2.3.	Prolifération cellulaire .....	69
2.4.	Mort cellulaire .....	73
2.5.	Evolution des protéines au cours du jeûne .....	77
<b>3.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>79</b>
3.1.	Organisation du filament branchial.....	79
3.2.	Les mécanismes de la plasticité tissulaire et cellulaire .....	80
3.3.	Suivi des protéines .....	92
<b>Chapitre 3 : Etude du mode d'acquisition des symbiotes et de leur plasticité.....</b>		<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>97</b>
1.1.	Matériel biologique .....	97
1.2.	Techniques de détection du mode d'acquisition des symbiotes .....	100
1.3.	Techniques de détection des symbiotes .....	101
1.4.	Techniques de caractérisation des symbiotes.....	103
<b>2.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>107</b>
2.1.	Variation du nombre de symbiotes détectables au CARD-FISH .....	107
2.2.	Mode d'acquisition des bactéries symbiotiques .....	107
2.3.	Suivi des populations bactériennes symbiotiques .....	112
<b>3.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>120</b>
3.1.	Mode de transmission des bactéries symbiotiques .....	120
3.2.	Plasticité des symbiotes bactériens.....	126
<b>Chapitre 4 : Conclusion générale et perspectives.....</b>		<b>137</b>
	Références.....	147
	Annexes.....	170

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Ecosystèmes marins à bases chimiosynthétiques.....	12
Figure 2 : Réaction d'oxydation du soufre. Schéma Maurin (2009). ....	17
Figure 3 : Bivalves associés à des bactéries symbiotiques chimioautotrophes. ....	20
Figure 4 : Habitat des Lucinidae. ....	25
Figure 5 : Micrographie en microscopie électronique à transmission montrant les bactéries symbiotiques internalisées dans un bactériocyte de Lucinidae (photo de Ball <i>et al.</i> , 2009). ....	27
Figure 6 : Micrographie d'une coupe transversale de la branchie de <i>Codakia orbicularis</i> après coloration de Goldner (photo Caro <i>et al.</i> , 2009). ....	28
Figure 7 : Coquilles de bivalves. ....	37
Figure 8 : Carte de localisation des sites de prélèvement. ....	38
Figure 9 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en œuvre chez <i>Codakia orbiculata</i> dans l'étude de la plasticité tissulaire et cellulaire de l'hôte. ....	40
Figure 10 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en œuvre chez <i>Lucina pensylvanica</i> dans l'étude de la plasticité tissulaire et cellulaire de l'hôte. ....	41
Figure 11 : Représentation schématique de l'incorporation du BrdU dans une cellule en phase S, cas d'un bactériocyte. ....	43
Figure 12 : Représentation schématique du principe de l'immunohistochimie indirecte sur coupe. ....	48
Figure 13 : Représentation schématique du principe de la technique CARD-FISH appliquée à la bactériologie. ....	53
Figure 14 : Dosage des protéines soufrées. ....	57
Figure 15 : Photographies des coquilles ouvertes des 2 espèces étudiées. ....	59
Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation de la branchie des Lucinidae. ....	60
Figure 17 : Structure du filament branchial de <i>Codakia orbiculata</i> . ....	62
Figure 18 : Histologie du filament branchial de <i>Lucina pensylvanica</i> . ....	64
Figure 19 : Comparaison de l'organisation cellulaire et tissulaire du filament branchial de <i>Codakia orbiculata</i> observé au CARD-FISH (A, D), au DAPI (B, E) et en histologie (C, F). ....	66
Figure 20 : Réorganisations cellulaire et tissulaire du filament branchial observées au CARD-FISH (A, B, C) et en histologie (D, E, F) chez <i>Codakia orbiculata</i> en recolonisation. ....	67
Figure 21 : Evolution de la population symbiotique analysée au CARD-FISH et au DAPI chez <i>Lucina pensylvanica</i> en décolonisation. ....	68

Figure 22 : <i>Lucina pensylvanica</i> ayant jeûné 14 mois avant d'être remis 26 jours dans le milieu. ....	69
Figure 23 : Micrographies de la masse viscérale de <i>Brachidontes exustus</i> obtenues au microscope à fluorescence pour validation du protocole BrdU.....	70
Figure 24 : Prolifération cellulaire chez <i>Codakia orbiculata</i> à T <sub>0</sub> .....	72
Figure 25 : Prolifération cellulaire chez <i>Codakia orbiculata</i> après huit jours de ré-infection. ....	74
Figure 26 : Micrographies du foie de <i>Rattus norvegicus</i> obtenues au microscope à fluorescence pour validation du protocole caspase 3.....	74
Figure 27 : Mort cellulaire chez <i>Codakia orbiculata</i> après cinq mois de jeûne prolongé.....	76
Figure 28 : Evolution de la concentration en protéines chez <i>Codakia orbiculata</i> au cours du jeûne....	77
Figure 29 : Evolution de la concentration en protéines totales chez <i>Lucina pensylvanica</i> au cours du jeûne. ....	78
Figure 30 : Représentation schématique des quatre hypothèses permettant d'expliquer les remaniements tissulaires au sein des filaments branchiaux chez <i>Codakia orbiculata</i> . ....	87
Figure 31 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en œuvre chez <i>Codakia orbiculata</i> dans l'étude du mode d'acquisition des symbiotes et de leur plasticité.....	98
Figure 32 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en œuvre chez <i>Lucina pensylvanica</i> dans l'étude de la plasticité des symbiotes. ....	99
Figure 33 : Représentation schématique du principe de la spectrométrie de fluorescence X. ....	103
Figure 34 : Représentation schématique du principe de la cytométrie en flux.....	105
Figure 35 : Evolution des populations symbiotiques de <i>Codakia orbiculata</i> et <i>Lucina pensylvanica</i> analysées par CARD-FISH. ....	108
Figure 36 : Micrographies en microscopie à fluorescence de branchies de <i>Codakia orbiculata</i> témoins. ....	109
Figure 37 : Micrographies en microscopie à fluorescence de branchies de <i>Codakia orbiculata</i> ayant jeûné 6 mois et recolonisé 8 jours. ....	110
Figure 38 : Micrographies en microscopie à fluorescence de frottis bactériens d' <i>Escherichia coli</i> . (gram-)......	111
Figure 39 : Micrographie en microscopie à fluorescence de branchies de <i>Codakia orbiculata</i> ayant jeûné 6 mois puis recolonisé 4 jours puis incubé en présence de BrdU.....	112
Figure 40 : Evolution du soufre chez <i>Codakia orbiculata</i> . ....	113
Figure 41 : Evolution du soufre chez <i>Lucina pensylvanica</i> au cours du jeûne.....	114
Figure 42 : Analyses par cytométrie en flux des populations de bactéries sulfo-oxydantes symbiotiques hébergées par <i>Codakia orbiculata</i> durant le jeûne. ....	116

Figure 43 : Analyses par cytométrie en flux des populations de bactéries sulfo-oxydantes symbiotiques hébergées par <i>Codakia orbiculata</i> durant la recolonisation. ....	117
Figure 44 : Analyses par cytométrie en flux des populations de bactéries sulfo-oxydantes symbiotiques hébergées par <i>Lucina pensylvanica</i> durant le jeûne. ....	119
Figure 45 : Hypothèse d'une multiplication intracellulaire des symbiotes en recolonisation. ....	120
Figure 46 : Hypothèse d'une acquisition environnementale des symbiotes en recolonisation. ....	121
Figure 47 : Schéma de synthèse. ....	140

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des dates d'échantillonnage pour <i>Codakia orbiculata</i> . .....	39
Tableau 2 : Récapitulatif des dates d'échantillonnage pour <i>Lucina pensylvanica</i> .....	39
Tableau 3 : Récapitulatif des milieux d'inclusion utilisés.....	45
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour la détection de la prolifération cellulaire par immunohistochimie.....	49
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des caractéristiques de l'anticorps utilisé pour la détection de l'apoptose par immunohistochimie.....	51
Tableau 6 : Synthèse des résultats relatifs à la prolifération cellulaire, obtenus par immunohistochimie sur coupes histologiques chez <i>Codakia orbiculata</i> . .....	71
Tableau 7 : Synthèse des résultats relatifs à la mort cellulaire, obtenus par immunohistochimie sur coupes histologiques chez <i>Codakia orbiculata</i> . .....	75

## LISTE DES ABBREVIATIONS

Ac : anticorps	EDTA : acide éthylène diamine tétracétique	Ppm : partie par million
ADN : acide désoxyribonucléique	EDX : Energy Dispersive X	PRO : proline
Ag : antigène	EFTEM : Energy Filtered Transmission Electron Microscopy	RubisCO : Ribulose 1-5 bisphosphate Carboxylase/Oxygénase
APS: adénosine 5'- phosphosulfate	FITC : Fluorescein IsoThioCyanate	S : Svedberg
ARG : arginine	FL : Fluorescence	SSC : Side SCatter
ARN : acide ribonucléique	g : gramme, unité d'accélération	TdT : terminal (deoxyribonucleotidyl) transferase
ARNr : acide ribonucléique ribosomal	HRP : Horseradish peroxydase	TRY : tryptophane
ATP : adénosine triphosphate	K : potassium	TSB : Trypticase Soy Broth
BrdU : 5-bromo-2- désoxyuridine	l : litre	TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
BSA : Bovine Serum albumin	m : mètre	UV : Ultra Violet
Ca : calcium	M : Molaire	% : pour cent
CARD-FISH : Fluorescence <i>in situ</i> hybridization and Catalyzed reporter deposition	MET : Microscope électronique à transmission	‰ : pour mille
CMF: cytométrie en flux	min : minute	° : degré
CYS : cysteine	mol : mole	°C : degré Celsius
DAPI : 4',6'-diamidino-2- phénylindole	pb: paire de bases	$\lambda$ : longueur d'onde
DNase : Désoxyribonucléase	PBS : Phosphate Buffered Saline	$\lambda_{em}$ : longueur d'onde d'émission
DO : densité optique	PCR : Polymerase Chain Reaction	$\mu$ : micro-
DTT : dithiothréitol	PFA : Paraformaldéhyde	c : centi-
dUTP : désoxyuridine triphosphate	pH : potentiel Hydrogène	m : milli-
	PH3 : phospho-histone 3	n : nano-
	PHE : phénylalanine	



**CHAPITRE 1 : LES ASSOCIATIONS  
SYMBIOTIQUES  
CHIMIOAUTOTROPHES EN MILIEU  
MARIN : CAS DES LUCINIDAE**



# 1. La symbiose

## 1.1. Les interactions durables

A travers la biosphère aucun organisme ne vit totalement isolé des autres êtres vivants. Ainsi, l'existence même d'un individu suppose l'établissement d'interactions impliquant des échanges avec d'autres organismes de la même espèce ou d'espèces différentes. Vers la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les lichénologues Albert-Bernhardt Frank et Anton de Bary définissent la symbiose comme le « vivre ensemble » d'espèces différentes. A une époque où le parasitisme est pratiquement la seule forme d'association étudiée, voire référencée dans les publications scientifiques, ces travaux originaux vont inspirer d'autres auteurs et seront rapidement étendus au règne animal, en commençant par les associations liant les algues aux animaux marins (Perru, 2006). Bien que la définition de De Bary inclue toutes les associations de deux espèces vivantes, le terme est communément employé pour définir les relations symbiotiques à bénéfice réciproque.

Les interactions entre les organismes peuvent être de courte durée ou se prolonger dans le temps. Ce contact prolongé crée une certaine promiscuité entre les individus qui entraîne des interactions durables de leurs génomes. Claude Combes (1995) définit les interactions durables comme étant : «les interactions entre génomes qui, soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs phénotypes, s'installent dans la durée». Elles s'opposent aux interactions instantanées telles les relations proies-prédateurs. Dans ce cas, le prédateur tire son énergie de la consommation de sa proie et l'information génétique de la victime est détruite, contrairement aux interactions durables qui préservent, au moins partiellement, le génome des partenaires.

Dans ce mémoire, nous utiliserons le mot symbiose pour parler des interactions durables qui lient deux organismes d'espèces différentes sans préjuger du coût et des bénéfices apportés par la relation.

Par convention, dans les interactions durables ou symbioses, le plus petit des partenaires est appelé *symbiote* et le plus gros des partenaires est appelé *hôte*, sans que cela ne préjuge de la nature des relations. Ces définitions permettent simplement de distinguer aisément, par la

notion de taille, les différents éléments structurant la relation symbiotique quand cela est possible.

## 1.2. Caractéristiques de la symbiose

En plus de la taille relative des partenaires, que nous avons défini précédemment, on peut caractériser les symbioses selon plusieurs critères déterminés par Smith & Douglas (1987) :

1. **Position relative des partenaires** : les interactions durables créent une certaine promiscuité entre les partenaires en contact direct. Si l'on se réfère à la position du symbiote par rapport à l'hôte, celui-ci peut se trouver à l'extérieur de l'hôte (*ectosymbiotique*), ou à l'intérieur de l'hôte (*endosymbiotique*). Ces deux types de symbioses peuvent coexister pour un même hôte. Dans le cas des endosymbioses, on distingue les endosymbioses extracellulaires où les symbiotes sont en dehors des cellules, et les endosymbioses intracellulaires dans lesquelles les symbiotes sont hébergés dans les cellules de l'hôte. Lorsque ces dernières sont spécialisées dans l'accueil de bactéries, on les nomme *bactériocytes*. Le modèle symbiotique qui fera l'objet de notre étude implique un endosymbiote intracellulaire hébergé par des bactériocytes.
2. **Nécessité de la relation** : traditionnellement, la symbiose est dite « *obligatoire* » quand un des deux partenaires ne peut survivre et se reproduire en l'absence de l'autre. Dans le cas contraire, la symbiose est dite « *facultative* ». Dans ce dernier cas, le symbiote qui vit en dehors de l'hôte est dit sous « *forme libre* », tandis que l'hôte dépourvu de symbiotes est dit « *aposymbiotique* ». Cependant, il semble plus réaliste de voir la nécessité de la relation symbiotique comme un continuum, le long duquel toutes les interactions hôte-symbiote sont possibles. En effet, certains hôtes peuvent très bien survivre en laboratoire en absence de leur symbiote, alors que dans leur environnement naturel, ils ne sont jamais retrouvés sous une forme aposymbiotique. C'est le cas par exemple de certaines symbioses à transmission verticale et notamment celle impliquant *Coriobacterium glomerans*, l'endosymbiote de l'insecte Pyrrhocoridae *Pyrrhocoris apterus* (Kaltenpoth *et al.*, 2009).
3. **Modes de transmission des symbiotes** : la pérennité des relations symbiotiques, et notamment de celles impliquant des symbiotes microbiens, repose sur la transmission des symbiotes au travers des générations d'hôtes. D'après Le Pennec *et al.* (1988) la

transmission des symbiotes, chez les invertébrés associés à des micro-organismes, peut se faire suivant trois modes :

**La transmission verticale** est intrinsèquement liée à la reproduction de l'hôte. Elle implique une acquisition directe des symbiotes via les gamètes de l'organisme hôte. C'est le cas par exemple des cyanobactéries *Prochloron* de l'ascidie coloniale *Trididemnum miniatum* (Hirose & Hirose, 2007), des archées et des bactéries associées à l'éponge *Corticium sp.* (Sharp *et al.*, 2007) ou des symbiotes chimioautotrophes des Solemyidae *Solemya reidi* (Cary, 1994) ou *Solemya velum* (Krueger *et al.*, 1996).

**La transmission horizontale**, au cours de laquelle l'acquisition des symbiotes, entre hôtes contemporains, qu'ils soient apparentés ou non, se fait indépendamment de la reproduction de l'hôte. **La transmission environnementale** correspond à une transmission horizontale à partir d'un stock de symbiotes libres dans l'environnement provenant d'individus déjà infectés. C'est le cas de la sépiole *Euprymna scolopes*, associée à la bactérie *Vibrio fisheri*, qui rejette tous les jours environ 90% de ses bactéries dans l'environnement (Boettcher *et al.*, 1996; McFall-Ngai, 1998; Nyholm & McFall-Ngai, 2004), facilitant ainsi la contamination des juvéniles qui se fait en quelques heures (Ruby & Lee, 1998). Les bactéries restantes se multiplient pour reconstituer le stock de symbiotes (Nyholm & McFall-Ngai, 2004). La transmission environnementale des symbiotes a été suggérée pour d'autres invertébrés associés à des endosymbiotes chimioautotrophes. C'est le cas des vers Siboglinidae *Riftia pachyptila* (Cary *et al.*, 1993; Nussbaumer *et al.*, 2006; Harmer *et al.*, 2008) et des bivalves Mytilidae de la sous-famille des Bathymodiolinae (Won *et al.*, 2003; Kádár *et al.*, 2005). Chez les bivalves Lucinidae, pour lesquels il n'existe pas de libération des symbiotes dans l'environnement par les individus déjà infectés, on parlera d'**acquisition environnementale** (Gros *et al.*, 1997; Gros *et al.*, 1998; Gros *et al.*, 1999; Gros *et al.*, 2003; Caro *et al.*, 2007; Gros *et al.*, 2011).

La transmission verticale peut être associée dans une moindre mesure à une acquisition environnementale des symbiotes, indépendante de la reproduction, comme c'est le cas chez les Vesicomysidae (Endow & Ohta, 1990; Cary & Giovannoni, 1993; Hurtado *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2008).

4. **Durée de l'association** : dans sa définition la plus simple, la symbiose inclue toutes les formes d'interactions entre organismes, ce qui comprend également la pollinisation des fleurs par les insectes ou les relations proies-prédateurs. Il convient de limiter cette définition aux interactions durables.
5. **Impact de l'association sur le bien-être des deux partenaires** : si l'on considère l'ensemble des échanges entre les organismes en symbiose, on peut distinguer trois grands types d'interactions durables à partir desquels on peut décliner plusieurs sous-types : le *parasitisme* où l'association a un effet favorable à l'un des deux partenaires et défavorable à l'autre, c'est le cas des bivalves infectés par les *Apicomplexa* du genre *Nematopsis* (Azevedo & Cachola, 1992; Tuntiwaranuruk *et al.*, 2004) ou des bivalves *Ruditapes philippinarum* infectés par *Vibrio tapetis* et sujets à la maladie de l'anneau brun (Paillard & Maes, 1990; Borrego *et al.*, 1996) ; le *commensalisme* où il existe un bénéfice pour l'un des partenaires sans qu'il n'y ait ni coût, ni avantage, pour l'autre. C'est le cas par exemple des cirripèdes associés aux baleines (Mignucci-Giannoni *et al.*, 1998; Kane *et al.*, 2008) ; le *mutualisme* où l'association est à bénéfice réciproque. C'est le cas de la sépiole *Euprymna scolopes*, associée à la bactérie *Vibrio fisheri* (Boettcher *et al.*, 1996; McFall-Ngai, 1998; Nyholm & McFall-Ngai, 2004; Lee *et al.*, 2009). Il existe un continuum d'interactions allant du parasitisme strict à la symbiose organo-intégrée ou organogénétique [le symbiote est devenu un organite cytoplasmique, comme c'est le cas des mitochondries (Margulis, 1993; 2004)], sur lequel on retrouve ces trois repères. C'est la balance entre coût et bénéfice qui permet de définir le type de relation qui lie l'hôte et son symbiote. Le long de ce continuum symbiotique, on peut parfois placer en des endroits différents, les symbiotes d'un même hôte. Ainsi, les *Symbiodinium* du clade C, principaux symbiotes associés au corail *Acropora cytherea*, seraient mutualistes tandis que ceux du clade A, plus rares, seraient plus proches du parasitisme que du mutualisme (Stat *et al.*, 2008).
6. **Degré de spécificité de l'association** : le niveau de différence taxinomique entre les différents hôtes avec lesquels le symbiote peut s'associer, et vice-versa, définit la spécificité de la relation. Plus la différence taxinomique est faible, plus le degré de spécificité de l'association est élevé.

**7. Type d'interaction** : en plus de toutes ces caractéristiques, il convient d'appréhender la symbiose en fonction du type d'avantage, métabolique ou comportemental, qu'elle confère à chacun des partenaires de l'association.

**Lorsque l'association confère des bénéfices trophiques** : les échanges trophiques qui régissent des symbioses, permettent de surpasser les limites trophiques des partenaires. Ceci peut se faire entre autres par la mise en commun de voies métaboliques complémentaires. Elles peuvent intervenir dans des relations impliquant :

- un autotrophe et un hétérotrophe :

Le partenaire autotrophe peut fournir des substances minérales au partenaire hétérotrophe en échange de molécules organiques. C'est le cas de la symbiose qui lie les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote du genre *Rhizobium* à certaines plantes légumineuses (principalement de la famille des Fabacées) (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995; Hirsch *et al.*, 2001). Ces bactéries possèdent un complexe enzymatique appelé nitrogénase qui permet la fixation biologique de l'azote (Luciński *et al.*, 2002). Les bactéries qui pénètrent les racines des plantes entraînent la formation de structures appelées nodosités ou nodules. En condition de micro-aérobie, la nitrogénase catalyse la réduction de l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) en ammonium ( $NH_3$ ) qui entre dans la composition des acides aminés (Mylona *et al.*, 1995). Les nodules sont un environnement très peu perméable à l'air, ce qui rend possible la fixation de l'azote par des nitrogénases bactériennes. En effet, dans la partie centrale des nodules, de fortes concentrations en leghémoglobine, protéine fixatrice d'oxygène, permettent un transport efficace de l'oxygène. De cette façon, le symbiote reçoit suffisamment d'oxygène pour produire de l'énergie, mais l'environnement reste faible en oxygène, ce qui empêche l'inactivation de la nitrogénase (Appleby, 1984). L'énergie nécessaire à la fixation de l'azote est apportée par la plante sous forme de substrats carbonés provenant de la photosynthèse. Les rhizobiacées libres dans l'environnement ne peuvent fixer l'azote, faute d'y trouver les conditions favorables.

Le partenaire autotrophe peut également fournir des molécules organiques en échange de substances minérales. C'est le cas des symbioses qui lient les algues unicellulaires

du genre *Symbiodinium* à de nombreux cnidaires (Gordon & Leggat, 2010). Les symbiotes, qui sont capables de photosynthèse, fournissent à leur hôte de l'oxygène et du carbone organique sous forme de glucides. Les déchets azotés et phosphorés de l'hôte sont utilisés en partie par le symbiote. La respiration de l'hôte et la photosynthèse se complètent, le CO<sub>2</sub> émis par la respiration servant à la photosynthèse pour la production d'O<sub>2</sub>.

Les interactions trophiques entre autotrophes et hétérotrophes sont à la base des associations symbiotiques chimioautotrophes en milieu marin qui seront développées dans la seconde partie de ce chapitre.

- deux hétérotrophes :

Les symbioses mutualistes impliquant deux hétérotrophes pour le carbone, peuvent permettre la digestion des aliments. C'est le cas des herbivores incapables de digérer la cellulose par exemple, et qui s'associent à des bactéries hétérotrophes productrices de cellulase. C'est également le cas des pucerons incapables de synthétiser certains acides aminés essentiels à leur métabolisme, qui s'associent à des bactéries du genre *Buchnera* capables d'effectuer la biosynthèse de ces acides aminés (Douglas, 1998).

-deux autotrophes :

Dans les sédiments marins anoxiques riches en méthane, des suintements froids, il existe des consortiums bactériens assimilables à des symbioses liant des archées à des bactéries sulfato-réductrices qui seraient à l'origine de l'oxydation biologique du méthane en condition anaérobie (Boetius *et al.*, 2000; Michaelis *et al.*, 2002; Hoffmeister & Martin, 2003). Ces consortiums sont constitués d'un cœur d'environ 100 cellules archaebactériennes entourées d'environ 200 cellules bactériennes (Boetius *et al.*, 2000).

**Lorsque l'association confère des bénéfices non trophiques :** ceux-ci peuvent être de natures variées, en voici quelques exemples. L'association peut être un atout pour échapper à la prédation. C'est le cas des organismes capables de bioluminescence. Cette dernière peut être générée, soit par l'organisme lui-même, comme chez les poissons Myctophidae caractérisés par la présence de photophores le long de leurs

corps (Turner *et al.*, 2009; Catul *et al.*, 2010), soit en s'associant à des bactéries du genre *Photobacterium* ou *Vibrio* capables de bioluminescence. C'est le cas des poissons *Monocentris japonica* associés à *Photobacterium fischeri* (Ruby & Nealson, 1976) et *Cleidopus gloriamaris* associés à *Vibrio fischeri* (Fitzgerald, 1977). C'est également le cas de la sépiole *Euprymna scolopes* (Wei & Young, 1989; McFall-Ngai, 1998; Nyholm & McFall-Ngai, 2004) Dans cette association, l'hôte utilise la lumière émise par ses symbiotes au niveau de la partie ventrale de son corps pour imiter la lumière de la lune et des étoiles et masquer son ombre, évitant ainsi d'être la proie de prédateurs nocturnes (Jones & Nishiguchi, 2004). Ces associations fournissent aux symbiotes un environnement riche en nutriments et aident leurs hôtes à échapper à leurs prédateurs. Par ailleurs, la symbiose peut également représenter une protection physique ou chimique pour les partenaires. L'endosymbiose procure en effet une protection physique au symbiote qui se trouve internalisé. Il existe également de nombreux cas de protection chimique contre la toxicité de certains éléments comme les substances toxiques de l'environnement (oxygène pour les bactéries anaérobies du tube digestif (Guarner & Malagelada, 2003), soufre toxique pour la chaîne respiratoire des eucaryotes (Grieshaber & Völke, 1998)). Certains symbiotes protègent l'hôte en produisant des substances toxiques. C'est le cas des symbiotes des pieuvres à anneaux bleus qui produisent de la tétrotoxine (Hwang *et al.*, 1989). Dans certains cas, l'association a un rôle de motilité. La flore intestinale du termite *Mastotermes darwiniensis* présente de nombreux micro-organismes dont les protistes *Mixotricha paradoxa* qui aident à la digestion de la cellulose. Ces protistes sont eux-mêmes couverts d'ectosymbiotes, des bactéries spirochètes qui leur permettent de se déplacer (Wenzel *et al.*, 2003).

### 1.3. Les concepts de cellule et d'individu

Le paroxysme des interactions durables se trouverait dans la symbiose organogénétique. Ainsi, une relation à l'origine parasitaire évoluerait au fil du temps en symbiose mutualiste intracellulaire avant d'atteindre le stade ultime de symbiose organo-intégrée. La théorie de l'origine endosymbiotique ou endocytobiotique de la cellule eucaryote a été principalement portée par Lynn Margulis qui présente dans son ouvrage « *Symbiosis in cell evolution* » (Margulis, 1993) la théorie de l'endosymbiose en série (Serial Endosymbiosis Theory)

(Margulis, 2004). Cette théorie est aujourd'hui admise par de nombreux biologistes pour expliquer l'origine de la mitochondrie et du chloroplaste (organites jouant un rôle majeur dans le métabolisme eucaryote puisqu'ils assurent la synthèse de l'ATP) et peut être étendue à d'autres organites tels le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le noyau (Dolan *et al.*, 2002).

« En fait il n'existe pas, et il n'a peut-être jamais existé (sauf à la naissance même de la vie) d'organisme qui n'établisse ou ne subisse d'interaction durable avec un autre organisme » (Combes, 1995). Cette généralisation de la symbiose amène à réfléchir à la notion d'individu (mot d'origine latine qui signifie corps indivisible). En effet, la plupart des organismes que nous nommons et qualifions d'individus (un homme, une vache ou une lucine par exemple) correspondent en fait aux membres les plus visibles d'un consortium d'individus.

## **2. Les associations symbiotiques chimioautotrophes en milieu marin**

### **2.1. Historique et définitions**

En milieu terrestre et dans la zone photique des milieux aquatiques, la majorité des réseaux trophiques reposent sur l'utilisation directe ou indirecte de la lumière comme source d'énergie. Les organismes photosynthétiques autotrophes (photoautotrophes) qui utilisent l'énergie du soleil pour transformer le dioxyde de carbone et l'eau en matière organique, constituent le premier maillon de la chaîne trophique. Cependant, en 1887, Sergei Winogradsky découvre que la bactérie *Beggiatoa* qui vit dans les sources sulfureuses terrestres, est capable d'utiliser l'oxydation du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) comme source d'énergie conduisant à la formation de granules de soufre intracellulaires (Ackert, 2006). Ses recherches sur d'autres modèles bactériens révèlent l'existence de procédés similaires avec le fer et l'azote. Ses recherches sur les bactéries nitrifiantes montrent comment les organismes lithotrophes fixent le CO<sub>2</sub> pour fabriquer des molécules organiques. C'est la **chimiolithoautotrophie**. Plus tard, le terme **chimiosynthèse** sera créé pour désigner la fixation du dioxyde de carbone à l'obscurité, par analogie au terme photosynthèse qui désigne la fixation du dioxyde de carbone en présence de lumière.

La chimiosynthèse se rapporte à deux types d'organismes : les procaryotes méthanotrophes (*chimioorganoautotrophes*) qui utilisent le méthane comme source d'énergie et de carbone, et les procaryotes chimiolithoautotrophes.

La découverte des sources hydrothermales profondes à la fin des années 70 (Lonsdale, 1977; Corliss *et al.*, 1979), puis des suintements froids (Paull *et al.*, 1984) a révélé l'existence de symbioses basées sur la chimiosynthèse. Ces découvertes se sont par la suite étendues à d'autres environnements marins, allant des sites d'apport exceptionnel de matière organique aux zones côtières de sédimentation (Dubilier *et al.*, 2008). Ces différents écosystèmes seront présentés plus en détail dans la partie qui suit.

## 2.2. Ecosystèmes concernés

### 2.2.1. Écosystèmes profonds

En 1840, dans son hypothèse azoïque, basée sur le constat que l'abondance de la vie décroît avec la profondeur, Edward Forbes fixe la limite de la vie en milieu marin à environ 550 mètres. Bien que diverses preuves furent apportées par plusieurs scientifiques, cette hypothèse mit plusieurs dizaines d'années à tomber en disgrâce (Anderson & Rice, 2006). Plus de cent ans plus tard, en 1977, la découverte des sources hydrothermales a révélé l'existence de véritables oasis de vie caractérisées par de fortes concentrations de micro-organismes libres et d'agrégats d'invertébrés (Lonsdale, 1977; Van Dover, 2000). Ces écosystèmes originaux ont été découverts à 2500 mètres de profondeur (Lonsdale, 1977), profondeur à laquelle la lumière ne pénètre plus et où les apports en carbone de la zone photique représentent moins de 5% (Suess, 1980). Des études portant sur les vers tubicoles des sources hydrothermales ont montré la présence de bactéries endosymbiotiques sulfo-oxydantes à l'intérieur d'un organe spécialisé nommé trophosome (Cavanaugh *et al.*, 1981; Felbeck, 1981; Cavanaugh, 1983). Des analyses isotopiques ont permis d'éliminer l'hypothèse de l'utilisation d'une source de carbone issue de la photosynthèse chez cet animal (Rau, 1981a) et ont permis d'affirmer que ces vers étaient vraisemblablement engagés dans une relation chimiosynthétique avec ces bactéries sulfo-oxydantes. Cette découverte fût la première d'une longue série, puisque par la suite, ce type d'endosymbiose chimiosynthétique a été mis en évidence chez des palourdes Vesicomidae (Fiala-Médioni & Métivier, 1986), des moules Mytilidae, des crevettes Bresiliidae (Van Dover *et al.*, 1988) et bien d'autres organismes. Ces découvertes en eaux

profondes ont aussi été réalisées pour des relations ectosymbiotiques comme pour les vers annélides Polychaeta (Desbruyères *et al.*, 1983) et les tubes des vers Siboglinidae *Riftia pachyptila* (López-García *et al.*, 2002) et *Lamellibrachia sp.* (Duperron *et al.*, 2009). Quel que soit le type de symbiose considéré, endo- versus ectosymbiose, les procaryotes méthanotrophes et chimiolithoautotrophes sont impliqués dans la chimiosynthèse (Dubilier *et al.*, 2008). La vie dans les écosystèmes hydrothermaux profonds serait donc basée sur la chimiosynthèse.

Les sources hydrothermales profondes (Fig. 1A) se forment à des profondeurs pouvant atteindre les 4000 mètres. Elles apparaissent au niveau des dorsales océaniques, zones de fortes activités volcaniques. L'activité volcanique fragilise la croûte océanique et y crée des fissures. L'eau de mer pénètre à l'intérieur de ces fissures sur plusieurs centaines de mètres de profondeur et réagit avec la roche chaude sous-jacente. Elle se réchauffe, s'acidifie et dissout les constituants basaltiques. Elle se charge en métaux (fer, zinc, manganèse, plomb, cuivre) et en éléments réduits ( $H_2S$ ,  $CO_2$ ,  $H_2$ ). Le fluide ainsi constitué (environ  $350^{\circ}C$ ) remonte jusqu'au plancher océanique. Au contact de l'eau de mer froide (environ  $2^{\circ}C$ ), il y a précipitation des minéraux qui s'accumulent autour des sorties de fluide et forment des cheminées.

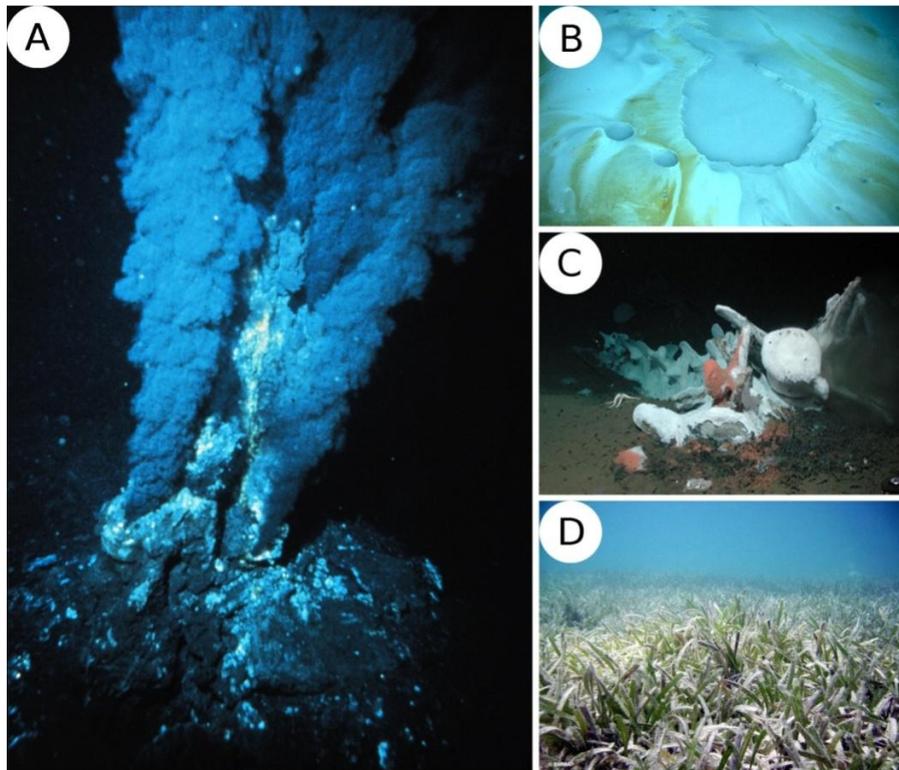


Figure 1 : Ecosystèmes marins à bases chimiosynthétiques.

(A) Fumeur noir d'un site hydrothermal de la ride médio-atlantique. (B) Cratères marquant la formation de lacs de saumure au niveau d'un volcan de boue du Golf du Mexique. Photo de l'expédition Lophelia II 2010, NOAA OER/BOEMRE. (C) Carcasse de baleine coulée. Photo Craig Smith. (D) Herbier à *Thalassia testudinum*. Photo BMMAP.

La composition du fluide varie d'un site à l'autre (Tunnicliffe *et al.*, 2003). Au sortir des cheminées, les organismes chimioautotrophes oxydent les éléments réduits du fluide, entrant ainsi en compétition avec l'oxydation chimique spontanée de ces composés.

Il existe également des sources hydrothermales en milieu peu profond, mais la chimiosynthèse y est moins bien représentée, puisque la présence de lumière y permet également le développement d'écosystèmes basés sur la photosynthèse (Tarasov *et al.*, 2005). Peu de temps après la découverte des écosystèmes des sources hydrothermales, des écosystèmes similaires ont été découverts au niveau des sources de fluides froids ou suintements froids (Paull *et al.*, 1984) (Fig. 1B). Ils correspondent à des zones d'émission de fluides de faible température à travers le sédiment, qui se situent entre 400 et 2000 mètres de profondeur. Les fluides sont particulièrement riches en méthane, qui provient de la matière organique réduite par la chaleur (méthane thermogénique) ou de l'activité méthanogène d'archées anaérobies du sédiment (méthane biogénique) (Jannasch & Taylor, 1984). Les fluides peuvent également contenir d'autres hydrocarbures ainsi que du sulfure d'hydrogène d'origine géologique ou biologique (issu de la réduction des sulfates par un consortium microbien). Cette association se compose d'une partie centrale, constituée d'Archae capables d'oxyder le méthane en conditions anaérobies, entourée de bactéries capables de réduire les sulfates (Boetius *et al.*, 2000; Michaelis *et al.*, 2002; Hoffmeister & Martin, 2003). C'est au niveau des suintements froids qu'ont été décrites les symbioses méthanotrophes des Mytilidae (Childress *et al.*, 1986) qui peuvent être associées, chez un même organisme, à des symbioses sulfoxydantes (Duperron *et al.*, 2005).

Les groupes taxinomiques eucaryotes décrits dans ces écosystèmes ressemblent à ceux que l'on retrouve au niveau des sources hydrothermales (Paull *et al.*, 1984). La faune des suintements froids se compose, en général, principalement de vers tubicoles polychètes Siboglinidae, de palourdes Vesicomidae et de moules Bathymodiolinae (Sibuet & Olu, 1998; Tunnicliffe *et al.*, 2003; Baco *et al.*, 2010).

## 2.2.2. Apport exceptionnel de matière organique

L'arrivée sur le plancher océanique de carcasses de cétacés (Fig. 1C) attire une faune variée parmi lesquels de nombreux invertébrés associés à des bactéries chimioautotrophes. La colonisation de la carcasse passe par trois stades (Smith & Baco, 2003) : Le premier stade est celui des charognards mobiles au cours duquel les tissus mous sont consommés par de nombreux individus appartenant à peu d'espèces différentes. Le second stade est celui des opportunistes durant lequel la macrofaune hétérotrophe envahit l'os et le sédiment environnant, enrichi en matière organique. Puis le dernier stade est celui de la décomposition des lipides contenus dans les os, par des bactéries sulfato-réductrices, ce qui produit des sulfures. Ceux-ci vont diffuser à travers les os jusqu'au sédiment et seront utilisés par des bactéries sulfo-oxydantes. La faune associée à ces écosystèmes se compose entre autres d'invertébrés. C'est le cas des Mytilidae du genre *Idas* (Deming *et al.*, 1997; Lorion *et al.*, 2009), et des Vesicomidae du genre *Vesicomya* (Deming *et al.*, 1997). D'autres invertébrés, tels les vers Siboglinidae *Osedax* (Rouse *et al.*, 2004; Braby *et al.*, 2007; Miyazaki *et al.*, 2008; Verna *et al.*, 2010), sont en symbiose avec des bactéries hétérotrophes capables d'extraire les composés organiques des os de baleine.

Un autre cas d'apport exceptionnel de matière organique, correspond à l'arrivée sur le plancher océanique de débris végétaux (feuilles, branches, troncs d'arbre...). Des bactéries sulfato-réductrices anaérobies dégradent la cellulose du bois en utilisant les sulfates de l'eau de mer comme accepteurs d'électrons. La réduction des sulfates en sulfures enrichit la surface du bois et l'eau environnante, favorisant ainsi le développement de bactéries sulfo-oxydantes libres ou symbiotiques (Duperron *et al.*, 2008; Laurent, 2009). Lorsqu'elles sont symbiotiques, ces bactéries sont associées à des invertébrés tels les bivalves Mytilidae des genres *Idas* et *Adipicola*, (Distel *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2007; Fujiwara *et al.*, 2010). Ces deux genres peuvent coloniser à la fois les débris organiques végétaux et les carcasses de baleines coulés (Lorion *et al.*, 2009).

On trouve également des bivalves foreurs Teredinidae et Xylophaginae, associés à des bactéries fixatrices d'azote, capables de dégrader la cellulose (Popham & Dickson, 1973; Waterbury *et al.*, 1983; Distel & Roberts, 1997; Nishimoto *et al.*, 2009).

Les vers Siboglinidae *Siboglinum* (Bright & Giere, 2005) et *Lamellibrachia* (Hughes & Crawford, 2008) ont également été trouvés sur des débris végétaux coulés.

Les débris végétaux se retrouvent entre 0 et 10 000 mètres de profondeur (Bruun, 1958) mais ont été rapportés comme support de communautés chimioautotrophes jusqu'à 1800 mètres de profondeur (Gros & Gaill, 2007).

### 2.2.3. Zones côtières de sédimentation

A la suite de la découverte des écosystèmes profonds, des recherches ont été menées sur des environnements plus facilement accessibles et ont révélé une variété comparable de relations symbiotiques.

L'eau qui s'infiltré dans les sédiments contient de l'oxygène dissous, qui est rapidement consommé par la biomasse de la couche superficielle, dont l'épaisseur varie de quelques millimètres à plusieurs centimètres (Ott *et al.*, 2005). La limite entre la couche superficielle et le sédiment réduit, est définie par un potentiel redox de discontinuité qui correspond à la couche de sédiment dans laquelle les processus d'oxydation sont remplacés par les processus de réduction (Fenchel & Riedl, 1970). Ces sulfures vont diffuser vers les couches supérieures oxiques et seront utilisés par les bactéries sulfo-oxydantes libres dans le milieu. Les zones d'abondance en oxygène et en sulfure pouvant être séparées de plusieurs centimètres, certaines bactéries sulfo-oxydantes s'associent à des invertébrés marins vivant à l'interface des couches oxique et anoxique du sédiment, rendant disponibles, à la fois, l'oxygène et les sulfures (Ott *et al.*, 2005).

Les concentrations en H<sub>2</sub>S des zones de sédimentation côtière (10 µM à 30 µM dans le sédiment des herbiers à *Thalassia testudinum* ; 1 mM à 10 mM dans le sédiment de mangrove (Maurin 2009 Thèse)) sont plus faibles que celles relevées au niveau des sources hydrothermales (supérieures à 10 mM (Jannasch, 1989)).

Dans les herbiers de Magnolophytes marines *Thalassia testudinum* (Fig. 1D), les symbiotes intracellulaires peuvent être associés à des bivalves Lucinidae dont les principaux genres en Guadeloupe et en Martinique sont *Codakia* et *Lucina (Linga)* (Frenkiel & Moueza, 1995; Gros *et al.*, 1996). Une étude récente a également révélé la présence de huit nématodes appartenant à trois genres différents (*Eubostrichus*, *Robbea* et *Stilbonema*) possédant un manteau de bactéries sulfo-oxydantes (Maurin 2009).

Deux Lucinidae (voir 3.2) se retrouvent également en mangrove : *Phacoides pectinatus* (également appelé *Lucina pectinata*) et *Anodontia alba* (Durand *et al.*, 1996; Frenkiel *et al.*, 1996). On retrouve également, dans ce milieu, des associations ectosymbiotiques telles celles

impliquant des ciliés solitaires du genre *Pseudovorticella* et les colonies de ciliés du genre *Zoothamnium* (Laurent 2009).

## 2.3. Adaptations aux milieux riches en sulfure d'hydrogène

### 2.3.1. Cycle du soufre

Le cycle du soufre présente une partie aérobie et une partie anaérobie qui sont, en général, superposées dans les sédiments marins. Ces deux parties se complètent par des échanges de composés soufrés. Les sulfures correspondent à trois formes chimiques différentes : le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) qui est un gaz soluble dans l'eau, l'ion hydrosulfure ( $HS^-$ ) et l'ion sulfure ( $S^{2-}$ ) (Millero *et al.*, 1988).

En anaérobie, le cycle du soufre est entièrement procaryote. Les bactéries sulfato-réductrices utilisent les composés organiques tels le lactate et le pyruvate, comme source de carbone et d'énergie pour convertir le sulfate ( $SO_4^{2-}$ ), qui correspond à la forme la plus oxydée du soufre, en sulfure. Le  $H_2S$  produit est rejeté dans le milieu. Dans la partie oxygène du sédiment les sulfures peuvent réagir spontanément avec l'oxygène pour donner des sulfites ( $SO_3^{2-}$ ), des thiosulfates ( $S_2O_3^{2-}$ ) ou des sulfates ( $SO_4^{2-}$ ) (Suzuki, 1999). Les micro-organismes sulfo-oxydants peuvent ainsi utiliser les composés soufrés plus ou moins réduits comme donneur d'électrons, en catalysant leur oxydation avec pour accepteur d'électron, l'oxygène (Fig. 2). L'un des intermédiaires de l'oxydation des sulfures en sulfates est le soufre élémentaire qui s'accumule à l'intérieur des bactéries sulfo-oxydantes sous forme de granules.

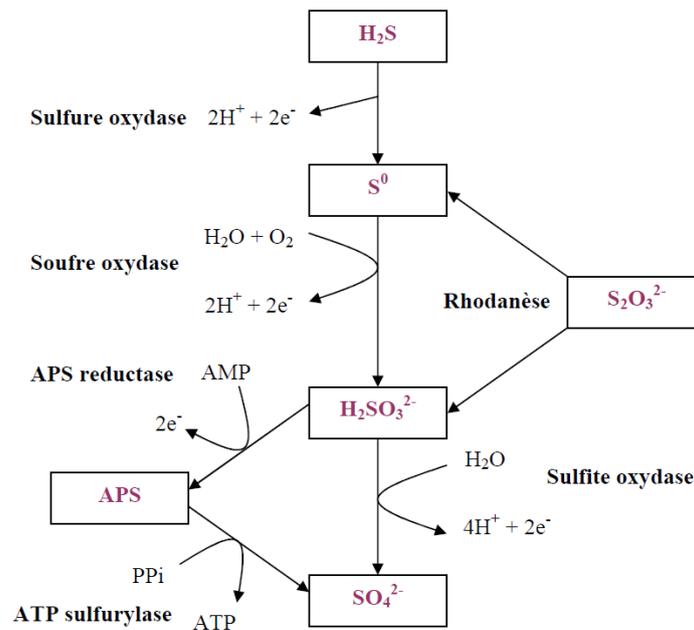


Figure 2 : Réaction d'oxydation du soufre. Schéma Maurin (2009).

$H_2S$  : sulfure d'hydrogène ;  $S^0$  : soufre élémentaire ;  $SO_3^{2-}$  : sulfites ;  $S_2O_3^{2-}$  : thiosulfates ;  $SO_4^{2-}$  : sulfates.

Pour avoir accès à la fois à l'oxygène et aux sulfures, les organismes symbiotiques associés à des bactéries sulfo-oxydantes se placent généralement à l'interface oxiqne/anoxiqne du sédiment. Quand les concentrations en sulfures sont faibles, certains bivalves symbiotiques mettent en place une stratégie adaptative originale, leur permettant d'avoir accès à plus de sulfure : l'élongation du pied (Arp *et al.*, 1984; Cary *et al.*, 1989; Dufour & Felbeck, 2003).

Il existe deux grandes voies métaboliques d'oxydation des composés soufrés réduits : la voie de l'ATP-sulfurylase et la voie de l'adénosine phosphosulfate (APS) reductase. La détection de l'une de ces deux voies, associée à celle de la fixation autotrophe du carbone, permet de mettre en évidence les symbiotes sulfo-oxydants. Le marqueur de gène fonctionnel de l'ATP-sulfurylase est le gène *soxB* (Meyer *et al.*, 2007), tandis que celui de l'APS reductase est le gène *AprA* (Meyer & Kuever, 2007).

L'oxydation des sulfures libère de l'énergie chimique sous forme d'ATP qui sera utilisée pour la fixation du dioxyde de carbone dissous dans l'eau de mer par les bactéries autotrophes. La fixation du carbone peut se faire via le cycle de Calvin-Benson dont l'enzyme clé est la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO) (Felbeck *et al.*, 1981; Felbeck, 1981) ou par le cycle des acides tricarboxyliques inverse (reverse TCA) dont l'enzyme clé est l'ATP citrate lyase (ACL). Ce dernier cycle a été mis en évidence chez des epsilon-protéobactéries autotrophes libres dans l'environnement des sources hydrothermales (Campbell & Cary, 2004) ou, associées à des invertébrés tels les ectosymbiotes du ver

polychète *Alvinella pompejana* (Campbell *et al.*, 2003), de la crevette *Rimicaris exoculata* (Hügler *et al.*, 2011) ou encore au niveau des endosymbiotes du gastéropode *Alviniconcha hessleri* (Suzuki *et al.*, 2005) et du ver Siboglinidae *Riftia pachyptila* (Robidart *et al.*, 2008). La détection des gènes codants pour la RubisCO et l'ACL ou la détection de leur activité enzymatique caractéristique, est utilisée pour mettre en évidence la fixation autotrophe du carbone.

Notons que des analyses phylogénétiques, basées sur les gènes de fonction impliqués dans les voies métaboliques d'oxydation des composés soufrés réduits et dans la fixation autotrophe du carbone, viennent aujourd'hui compléter les analyses phylogénétiques basées sur l'étude de l'ARN ribosomal 16S (Spiridonova *et al.*, 2006; Duperron *et al.*, 2007; Vrijenhoek *et al.*, 2007; Harada *et al.*, 2009).

### 2.3.2. Stratégies de détoxification du H<sub>2</sub>S

Le sulfure d'hydrogène est un composé toxique pour la respiration des organismes aérobies. Il inhibe les métalloprotéines comme les hémoglobines, ce qui altère le transport d'oxygène. Il inhibe également la cytochrome c oxydase de la chaîne respiratoire de la mitochondrie ce qui empêche la production d'ATP (Nicholls & Kim 1981; Grieshaber & Völke, 1998).

Les animaux vivants dans les milieux réduits doivent mettre en place des stratégies physiologiques et comportementales afin de pallier la toxicité des sulfures. Plusieurs options s'offrent à eux : se déplacer pour les éviter, passer au métabolisme anaérobie, s'imperméabiliser pour exclure les sulfures des tissus sensibles, ou oxyder le sulfure en le transformant en une forme moins toxique (McMullin *et al.*, 2007). Toutefois, pour les organismes enfouis dans le sédiment et donc peu mobiles comme les bivalves, la stratégie de fuite est inadaptée. Bien que peu documentés, les changements métaboliques existent. Ainsi, le ver oligochète *Tubificoides benedii* est capable de passer temporairement d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie quand la concentration en sulfure est élevée (Grieshaber & Völke, 1998). Mais, les stratégies d'élimination et d'oxydation des sulfures sont les mieux renseignées. Ces stratégies peuvent coexister. La fabrication de tube protecteur ou de cuticule épaisse permet de réduire l'exposition des tissus externes aux sulfures. L'association à des bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes, permet également de se protéger de l'exposition aux sulfures. Les tubes des Siboglinidae *Riftia pachyptila* (López-García *et al.*, 2002) et *Lamellibrachia sp.* sont colonisés par des gamma-protéobactéries probablement sulfo-

oxydantes (Duperron *et al.*, 2009). L'annélide polychète *Alvinella pompejana* (Desbruyères *et al.*, 1998) et les nématodes de la famille des Desmodoridae présentent également des bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes (Ott *et al.*, 2005; Himmel *et al.*, 2009; Maurin *et al.*, 2010). Des inclusions cellulaires contenant des sulfures (sulfide oxidizing bodies ou SOB), initialement décrites chez le bivalve *Solemya reidi* (Powell & Somero, 1985), ont également été observées dans d'autres espèces symbiotiques, notamment dans les bactériocytes du Lucinidae de mangrove *Phacoides pectinatus* (Liberge *et al.*, 2001) et dans l'intestin et l'épiderme de l'annélide *Urechis caupo* (Arp *et al.*, 1995). Comme leur nom l'indique, ces structures permettent l'oxydation des sulfures. D'après Liberge (2001), l'absence de ces structures chez les Lucinidae des herbiers laisse à penser qu'elles pourraient représenter chez le Lucinidae de mangrove *Phacoides pectinatus*, une adaptation à l'environnement plus sélectif, dans lequel il vit.

Une autre adaptation consiste à fixer rapidement les sulfures à l'hémoglobine. *Riftia pachyptila* en est un exemple édifiant puisque ce ver possède trois types d'hémoglobine, une cytoplasmique et deux vasculaires, capables de fixer l'oxygène et le sulfure sur des sites différents (ARP *et al.*, 1987; Zal *et al.*, 1998). Ceci empêche à la fois l'oxydation spontanée des sulfures et l'inhibition de la cytochrome c oxydase. La présence d'hémoglobine fixatrice de sulfure a également été démontrée chez les bivalves symbiotiques des familles Lucinidae (Dando *et al.*, 1985; Kraus & Wittenberg, 1990; Lebata, 2001; Ball *et al.*, 2009), Solemyidae (Doeller *et al.*, 1988) et Vesicomidae (Arp *et al.*, 1984).

### **3. Les associations bivalves-bactéries chimioautotrophes**

Il existe cinq familles de bivalves associées à des bactéries symbiotiques chimioautotrophes : les Mytilidae, les Solemyidae, les Thyasiridae, les Vesicomidae et les Lucinidae (Fig. 3).

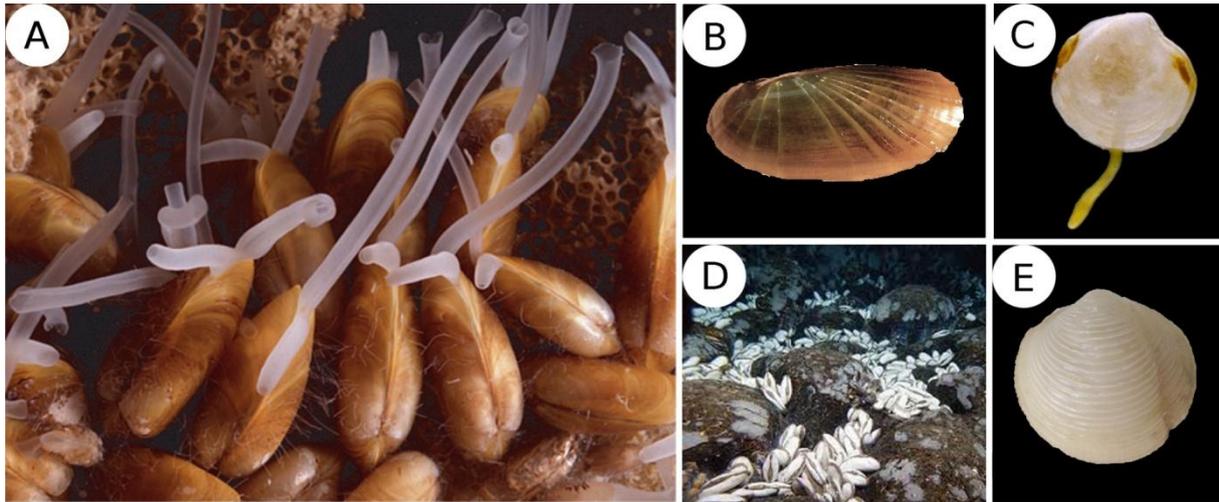


Figure 3 : Bivalves associés à des bactéries symbiotiques chimioautotrophes.

(A) Spécimens de Mytilidae de l'espèce *Adipicola pacifica* colonisant une vertèbre de baleine. Photo Fujiwara *et al.* (2007). (B) Spécimen de Solemyidae de l'espèce *Solemya velum*. Photo Frank Stewart. (C) Spécimen de Thyasiridae de l'espèce *Thyasira flexuosa*. Photo Suzanne Dufour (D) Spécimens de Vesicomysidae de l'espèce *Calyplogena magnifica*. Photo WHOI. (E) Spécimen de Lucinidae de l'espèce *Lucina pennsylvanica*.

### 3.1. Les bivalves symbiotiques autres que les Lucinidae

#### 3.1.1. Les Mytilidae

Les Mytilidae symbiotiques (Fig. 3A) appartiennent à deux sous-familles distinctes, la sous-famille des Modiolinae qui correspond aux espèces associées aux débris organiques et la sous-famille des Bathymodiolinae qui correspond aux espèces des sources hydrothermales et des suintements froids (Miyazaki *et al.*, 2010). Ils sont associés à des gamma-protéobactéries. Leur taille varie de 3 à 40 cm en fonction des espèces (Duperron *et al.*, 2009). Les espèces de petite taille, appartenant aux genres *Adipicola* (Distel, 2000; Gros & Gaill, 2007; Fujiwara *et al.*, 2010), *Benthomodiolus* (Distel, 2000), *Idas* (Turner, 1973; Distel *et al.*, 2000; Gros & Gaill, 2007; Pailleret *et al.*, 2007) et *Myrina* (Knudsen, 1961; Turner, 1973; Distel, 2000), se retrouvent généralement associées aux débris organiques (Deming *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 2007; Gros & Gaill, 2007; Fujiwara *et al.*, 2010) tandis que les espèces de grande taille, appartenant aux genres *Bathymodiolus* (Nelson *et al.*, 1995) et *Gigantidas* (Von Cosel & Marshall, 2003), se retrouvent généralement au niveau des sources hydrothermales et des suintements froids. Ils semblent absents des sites situés à plus de 3600 mètres de profondeur (Sibuet & Olu, 1998). Une étude phylogénétique récente menée par Lorion *et al.* (2010), sur

plus de 200 individus a permis de mettre en évidence une spéciation allopatrique des Mytilidae symbiotiques et a confirmé l'hypothèse selon laquelle les moules associées aux écosystèmes profonds ont émergé à partir des espèces associées aux débris organiques.

Les Mytilidae symbiotiques s'associent avec des bactéries sulfo-oxydantes mais présentent également l'originalité de pouvoir aussi s'associer à des bactéries méthanotrophes. La sulfo-oxydation et la méthanotrophie se manifestent au travers d'endosymbiotes extracellulaires et intracellulaires. Ainsi, il existe des endosymbioses sulfo-oxydantes extracellulaires (Gros & Gaill, 2007; Duperron *et al.*, 2008) et intracellulaires (Powell & Somero, 1986), des endosymbioses méthanotrophes intracellulaires (Childress *et al.*, 1986; Fujiwara *et al.*, 2000) et, plus surprenant encore, des doubles endosymbioses intracellulaires, impliquant à la fois des bactéries sulfo-oxydantes et méthanotrophes, hébergées dans les mêmes bactériocytes de certains *Bathymodiolus* (Fisher *et al.*, 1993; Duperron *et al.*, 2005). La moitié des espèces décrites possèdent uniquement des symbiotes sulfo-oxydants, trois espèces possèdent uniquement des symbiotes méthanotrophes et six espèces sont connues pour présenter les deux types de symbiotes (Won *et al.*, 2008).

Bien que la transmission verticale ait été suggérée chez *Bathymodiolus thermophilus* (Cary *et al.*, 1993), plusieurs éléments suggèrent une transmission environnementale des symbiotes chez les Mytilidae symbiotiques. En effet, des ouvertures au niveau des membranes des bactériocytes (Le Pennec *et al.*, 1988; Salerno *et al.*, 2005), des expériences de décolonisation et de recolonisation bactérienne (Kádár *et al.*, 2005) ainsi qu'une analyse génétique portant sur les populations de symbiotes et les hôtes de deux espèces de *Bathymodiolus* (Won *et al.*, 2003) laissent à penser que les symbiotes proviennent de bactéries environnementales.

### 3.1.2. Les Solemyidae

La famille des Solemyidae (Fig. 3B) comprend environ 25 espèces appartenant à deux genres, *Acharax* et *Solemya*, situés entre 0 et 1500 mètres de profondeur (Oliver *et al.*, 2011). Les individus du genre *Acharax* ont été référencés au niveau des sources hydrothermales (Beninger & Le Pennec, 1997) et les deux genres ont été observés au niveau des suintements froids (Sibuet & Olu, 1998). Les nombreuses études menées sur les membres du genre côtier *Solemya* ont permis de mieux comprendre la famille des Solemyidae (Stewart & Cavanaugh, 2006). Tous les Solemyidae sont associés à des gamma-protéobactéries intracellulaires capables d'oxyder les sulfures et les thiosulfates (Anderson *et al.*, 1987). L'analyse par PCR

des gamètes, des œufs et des larves semblent indiquer qu'elles sont transmises verticalement (Cary, 1994; Krueger *et al.*, 1996). Les Solemyidae vivent enfouis dans des terriers en forme de Y ou de U à l'interface oxiqne-anoxique du sédiment. *Solemya velum* possède deux hémoglobines cytoplasmiques, l'une d'entre elles réagit uniquement avec l'oxygène, tandis que l'autre réagit à la fois avec l'oxygène et les sulfures (Doeller *et al.*, 1988). Les acides aminés libres, taurine et thiotaurine, pourraient être des composés de stockage et de transport du soufre réduit, lorsque les concentrations environnementales sont faibles (Joyner *et al.*, 2003).

### 3.1.3. Les Thyasiridae

Les Thyasiridae symbiotiques (Fig. 3C) sont, quant à eux, des bivalves de petite taille (souvent moins d'un centimètre) qui, tout comme les Mytilidae, ont la particularité de posséder à la fois des endosymbiotes intracellulaires (c'est le cas uniquement chez *Maorithyas hadalis* (Fujiwara *et al.*, 2001)) et des endosymbiotes extracellulaires présents chez tous les autres membres symbiotiques de la famille (Southward, 1986). Ils sont généralement associés uniquement à des bactéries sulfo-oxydantes, à l'exception de l'espèce *Maorithyas hadalis* (Fujiwara *et al.*, 2001) qui est également associée à des bactéries méthanotrophes. Le genre *Thyasira* a la particularité de regrouper à la fois des espèces symbiotiques et non symbiotiques (Southward, 1986). Selon Dufour (2005), l'observation de la structure des branchies permet de distinguer trois types de branchies chez les Thyasiridae dont deux sont symbiotiques. Dans le type 2, seules deux espèces sont symbiotiques (*Thyasira* (*Parathyasira*) *equalis* et *Axinulus croulinensis*) tandis que dans le type 3, caractéristique des genres *Conchocele* et *Thyasira*, toutes les espèces sont symbiotiques. Dans les deux types, les symbiotes extracellulaires sont confinés dans un espace délimité par la membrane des bactériocytes et les microvillosités.

L'absorption des sulfures se fait par le pied des bivalves qui peut s'allonger et mesurer jusqu'à trente fois la taille de la coquille permettant l'accès aux poches de sulfure du sédiment (Dufour & Felbeck, 2003). L'analyse phylogénétique des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S bactérien de 3 espèces symbiotiques, a permis de montrer que chaque espèce abrite un phylotype unique de symbiote qui appartient à une lignée distincte des gamma-protéobactéries sulfo-oxydantes (Rodrigues & Duperron, 2011).

### 3.1.4. Les Vesicomyyidae

Les Vesicomyyidae (Fig. 3D) vivent pour la plupart enfouis à l'interface oxygène-anoxique des sédiments des milieux réduits riches en sulfures. Krylova & Sahling (2010) proposent de diviser cette famille en deux sous-familles : les Vesicomyyinae et les Pliocardiinae. La sous-famille des Vesicomyyinae ne comprend que le genre *Vesicomyya*. Il s'agit de bivalves de petite taille (moins de 10 mm), chez qui la présence de bactéries à l'intérieur des branchies a été rapportée sans pour cela qu'une quelconque symbiose chimioautotrophe n'ait été mise en évidence. La sous-famille des Pliocardiinae comprend des individus de moyenne et grande tailles appartenant à quinze genres différents, tous associés à des gamma-protéobactéries intracellulaires capables d'oxyder les sulfures. Les sulfures sont absorbés par le pied des bivalves puis transportés par une hémoglobine contenant du zinc, tandis que l'oxygène et le dioxyde de carbone sont absorbés par le siphon (Arp *et al.*, 1984). Chez le bivalve Vesicomyyidae *Calyplogena magnifica*, ce n'est pas l'hémoglobine qui fixe l'H<sub>2</sub>S mais un composé dissous dans le sérum qui pourrait être de nature lipoprotéique (Zal *et al.*, 2000). Les symbiotes sont transmis principalement verticalement (Endow & Ohta, 1990; Cary & Giovannoni, 1993. Hurtado *et al.*, 2003;) et dans une moindre mesure horizontalement (Stewart *et al.*, 2008).

## 3.2. Les Lucinidae

Les Lucinidae (Mollusca, Bivalvia, Lucinoidea, Lucinidae) (Fig. 3E) constituent la cinquième famille de bivalves symbiotiques, associés à des bactéries chimioautotrophes. Ce sont des bivalves à sexes séparés qui possèdent une coquille équivalve blanchâtre, plus ou moins aplatie et dénuée de nacre. Les valves sont ornées de stries concentriques (Grassé, 1960). Certaines structures anatomiques comme l'intestin et les palpes labiaux, sont réduites pour laisser place à des branchies hypertrophiées qui hébergent des bactéries endosymbiotiques sulfo-oxydantes.

Les Lucinidae sont présents à des profondeurs variables, allant de la zone intertidale à plus de 2100 mètres, bien que la majorité des espèces se trouvent dans des zones peu profondes. Ils occupent des habitats tout aussi divers, allant des sédiments de mangrove (Frenkiel *et al.*, 1996; Lebata, 2001) et d'herbier de Magnolophytes marines (Frenkiel & Moueza, 1995; Gros *et al.*, 1998) aux sites hydrothermaux (Glover *et al.*, 2004), en passant par les fjords (Dando *et*

*al.*, 1985) et les suintements froids (Salas & Woodside, 2002; Olu-Le Roy *et al.*, 2004; Brissac *et al.*, 2011).

Ce sont les mollusques les plus abondants des herbiers à *Thalassia testudinum*. L'enchevêtrement des racines et des rhizomes de ces Magnolophytes marines permet leur protection contre les prédateurs. La compétition avec les autres bivalves est faible puisque contrairement aux autres, ils sont capables de vivre dans des milieux riches en sulfure. Leur présence permet la diminution des sulfures de l'eau interstitielle, dont l'accumulation est néfaste pour les Magnolophytes (Reynolds *et al.*, 2007).

L'analyse des concentrations en H<sub>2</sub>S montre l'existence d'un gradient allant de 10 µM en surface du sédiment, à 30 µM à 15 cm de profondeur (Maurin, 2009). Comparativement aux valeurs obtenues en mangrove (1 mM à 10 mM), ou au niveau des sources hydrothermales (supérieures à 10 mM), ces valeurs sont relativement faibles. L'herbier à *T. testudinum* est donc un environnement faiblement réduit. Il comprend une courte zone oxygène claire et très peu réduite en surface, et une zone sombre, plus réduite en profondeur.

Les Lucinidae occupent un terrier en forme de U qui communique avec la surface du sédiment (Fig. 4). Ils ne possèdent pas de siphon inhalant mais creusent toutefois un conduit inhalant à l'aide de leur pied pour permettre l'entrée d'oxygène et de matière organique dans le terrier. Le siphon exhalant permet l'évacuation des déchets à travers le conduit exhalant. Ils peuvent creuser, sous leur terrier, quatre à cinq tunnels dans lesquels ils introduisent leur pied extensible (Cary *et al.*, 1989) afin d'atteindre les poches de sulfure présentes dans le sédiment.

La part de nutrition apportée par la filtration reste mal connue et semble dépendre de l'espèce. Ainsi l'observation de l'anatomie de *Divaricella quadrisulcata* suggère que cette espèce est au moins partiellement dépendante de la filtration pour son alimentation (Gros *et al.*, 2000). C'est également le cas des larves non symbiotiques de *Codakia orbicularis* nourries artificiellement (Gros *et al.*, 1997). Chez *Lucinoma aequizonata* l'utilisation de phytoplancton marqué a permis de démontrer l'acquisition du carbone à partir de particules alimentaires filtrées (Duplessis *et al.*, 2004a). Toutefois, l'originalité de ces symbioses est apportée par la capacité des bactéries autotrophes à fixer le carbone dissous dans l'eau de mer via le cycle de Calvin-Benson.

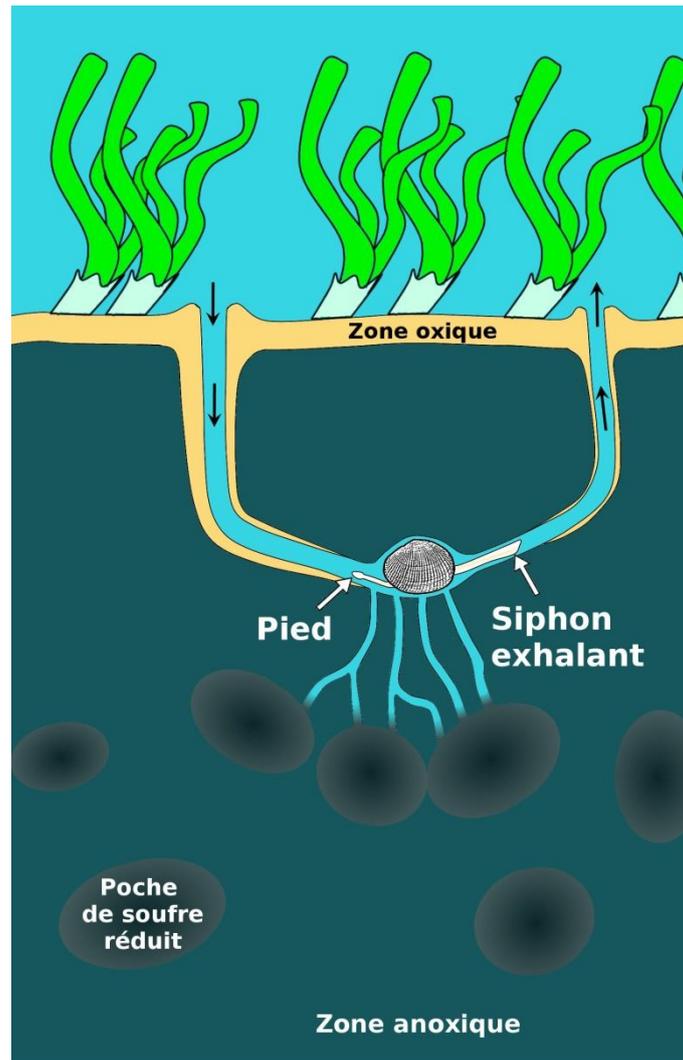


Figure 4 : Habitat des Lucinidae.

Les symbiotes sont localisés dans des cellules spécialisées des filaments branchiaux dont l'assemblage constitue la branchie. Ces cellules sont appelées bactériocytes. Brissac *et al.* (2009) considèrent que les branchies des bivalves du genre *Codakia* hébergent  $3 \times 10^9$  bactéries par gramme de branchie.

Le développement embryonnaire a été décrit chez *Codakia orbicularis* (Gros *et al.*, 1997) et *Lucinoma aequizonata* (Gros *et al.*, 1999) et a permis de démontrer l'absence de symbiotes chez les sub-adultes élevés au laboratoire, en eau de mer filtrée à  $0,22 \mu\text{m}$ . Les juvéniles aposymbiotiques de *C. orbicularis* peuvent acquérir des symbiotes au contact du sédiment (Gros *et al.*, 1998), qui contient des bactéries compétentes libres (Gros *et al.*, 2003). L'analyse par cytométrie en flux de la population bactérienne au sein des branchies de *C. orbicularis* a mis en évidence la présence de sous-populations bactériennes différenciées en fonction de

leur taille et de leur contenu génomique (Caro *et al.*, 2007). La présence de plusieurs copies de génome (jusqu'à vingt) au sein d'une même cellule, suggère que la réplication du matériel génétique n'est pas suivie d'une division de la cellule bactérienne. Ainsi, la division des symbiotes à l'intérieur de la branchie serait inhibée. Tous ces éléments suggèrent une acquisition environnementale des symbiotes de cette espèce.

Comme tous les symbiotes sulfo-oxydants décrits à ce jour, les bactéries symbiotiques des Lucinidae (Fig. 5) possèdent une double membrane caractéristique des bactéries gram-négatives. Elles appartiennent aux gamma-protéobactéries.

D'après Gros (1997) : elles mesurent entre 0,8 et 5  $\mu\text{m}$  en fonction de l'espèce. Elles sont incluses individuellement dans des vacuoles de la cellule hôte. Elles possèdent deux types d'inclusions : des inclusions cytoplasmiques (moins de 80 nm de diamètre) qui correspondent sans doute à des réserves carbonées, ainsi que des inclusions périplasmiques claires aux électrons (jusqu'à 0,75  $\mu\text{m}$  de diamètre), entourées d'une membrane. Il s'agit de réserves de soufre élémentaire dissous lors de la déshydratation des échantillons (Shively, 1974; Vetter, 1985; Lechaire *et al.*, 2006; Lechaire *et al.*, 2008). L'analyse du contenu en soufre élémentaire en fonction de la taille des symbiotes a montré que la quantité de soufre augmente avec la taille de la cellule, les plus grands volumes cellulaires permettant le stockage d'une plus grande quantité de soufre (Caro *et al.*, 2007).

En comparant les séquences du gène de l'ARN 16S des symbiotes de six espèces de Lucinidae caribéens, il s'est avéré que les séquences étaient identiques à 100% (Durand & Gros, 1996b; Durand *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2003) ce qui a amené les auteurs de ces études à conclure à l'existence d'une seule et même espèce bactérienne chez les Lucinidae. Une étude récente de Brissac *et al.* (2011), également basée sur la comparaison des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, a montré l'existence de 3 clades bactériens différents parmi les 17 séquences analysées provenant des symbiotes de 17 espèces d'hôtes. Ceci confirme l'hypothèse de Durand & Gros (1996b) selon laquelle plusieurs espèces d'hôte peuvent s'associer à la même espèce de symbiote. Partant de ces observations, Brissac *et al.* (2011) proposent que les Lucinidae ne co-évoluent pas avec leurs symbiotes, mais s'associent aux bactéries compétentes présentes localement, dans leur environnement.

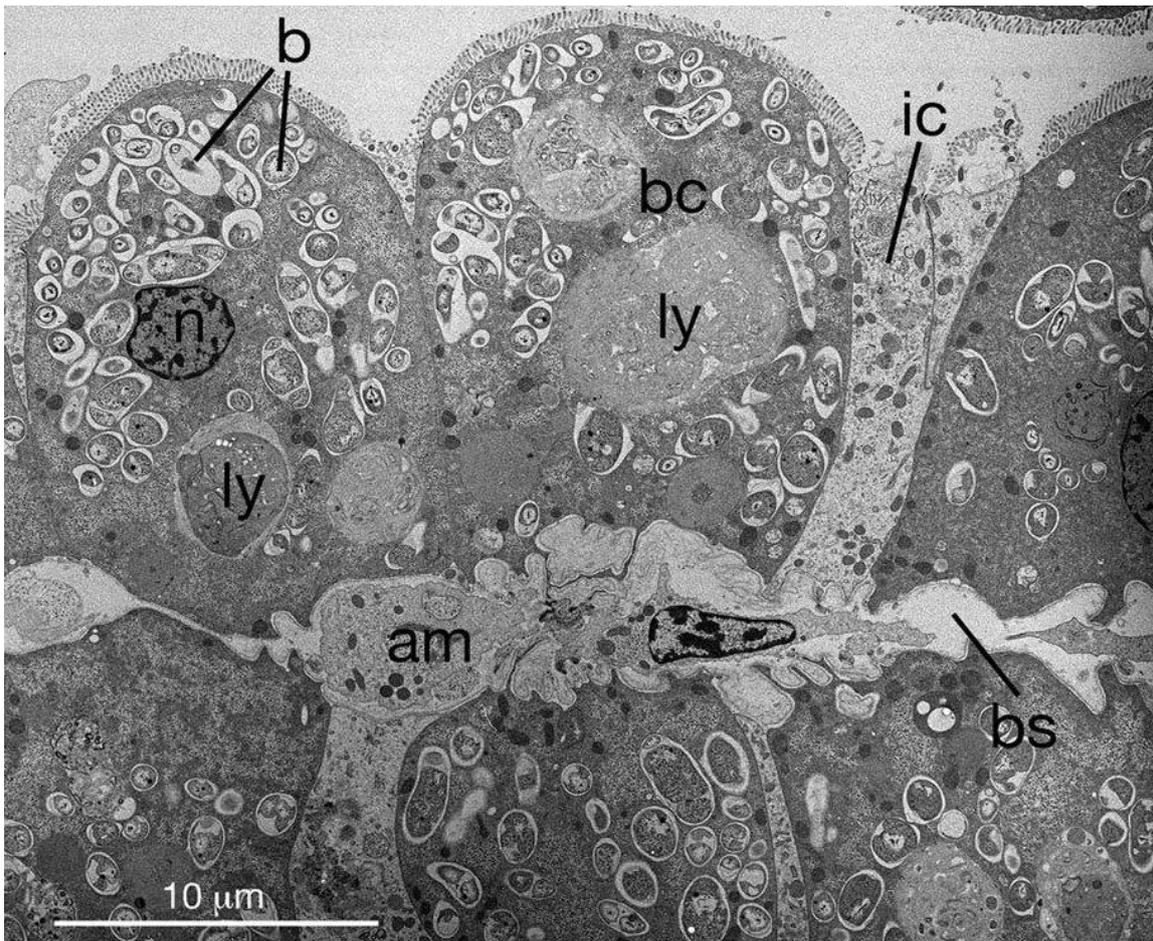


Figure 5 : Micrographie en microscopie électronique à transmission montrant les bactéries symbiotiques internalisées dans un bactériocyte de Lucinidae (photo de Ball *et al.*, 2009).

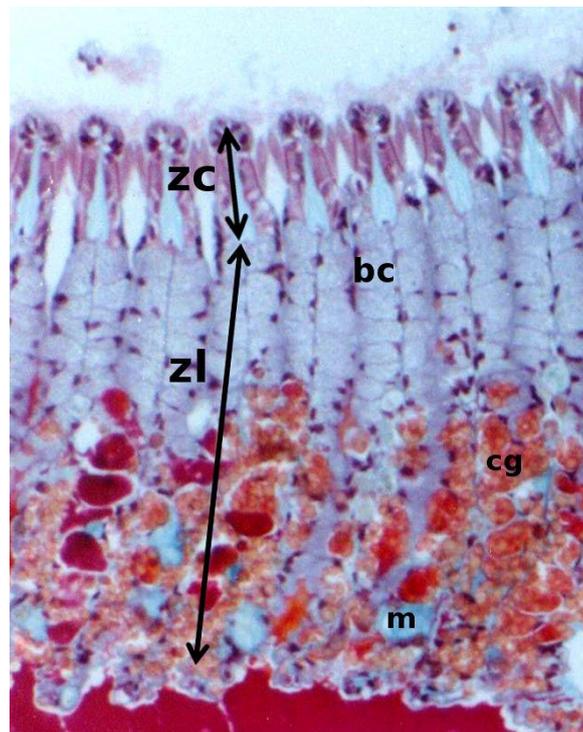
Les bactéries symbiotiques (b) contenues individuellement dans des vacuoles, sont caractérisées par la présence de granules de soufre qui apparaissent clairs aux électrons . am : amoebocyte ; bc : bactériocyte ; bs : lacune sanguine ; ic : cellule intercalaire ; ly : lysosome ; n : noyau du bactériocyte.

Les études menées sur *Lucinoma aequizonata* ont montré que les symbiotes utilisent le nitrate comme accepteurs d'électrons au lieu de l'oxygène, plus rare dans le sédiment. Ceci permet d'éviter la concurrence pour l'oxygène entre l'hôte et son symbiote (Hentschel *et al.*, 1993; Hentschel & Felbeck, 1995). Chez *Codakia orbicularis*, l'hypothèse d'une utilisation des nitrates pour la respiration des symbiotes a été rejetée, et l'utilisation de l'oxygène, abondant dans l'environnement de cette lucine, a été clairement démontrée (Duplessis *et al.*, 2004b). Ces exemples suggèrent que les stratégies de respiration des symbiotes varient d'un Lucinidae à l'autre et en fonction de l'environnement.

La façon la plus simple d'observer les conséquences d'une interaction durable est de pouvoir maintenir en laboratoire les partenaires de l'association, et ensemble, et isolés. Comme d'autres invertébrés symbiotiques, l'association Lucinidae-bactérie peut être maintenue en

laboratoire mais pour le moment aucune culture pure de gamma-protéobactéries chimioautotrophes associées à des invertébrés marins n'a pu être obtenue. Toutefois, des tentatives d'enrichissement menées sur les epsilon-protéobactéries ectosymbiotiques d'*Alvinella pompejana* ainsi que sur celles libres dans l'environnement, ont été conduites avec succès (Campbell *et al.*, 2001).

Chez les Lucinidae, la présence d'hémoglobine fixatrice de sulfure a été détectée dans les tissus branchiaux de plusieurs espèces telles que *Anodontia edentula* (Lebata, 2001), *A. ovum* (Ball *et al.*, 2009), *Myrtea spinifera* (Dando *et al.*, 1985), *Phacoides pectinatus* (Kraus & Wittenberg, 1990). Ce dernier modèle a fait l'objet de plusieurs études. La lucine *Phacoides pectinatus* possède trois hémoglobines : l'hémoglobine I fixe l' $H_2S$  de manière réversible tandis que la II et la III sont incapables de s'y lier (Gavira *et al.*, 2008; Pietri *et al.*, 2009). La branchie des Lucinidae se compose d'un assemblage de filaments branchiaux (Fig. 6).



**Figure 6 :** Micrographie d'une coupe transversale de la branchie de *Codakia orbicularis* après coloration de Goldner (photo Caro *et al.*, 2009).

La branchie est constituée d'un assemblage de filaments branchiaux. Pour chaque filament on distingue ici la zone ciliée (zc) et la zone latérale (zl). La zone latérale se compose de quatre types cellulaires dont trois sont clairement visibles ici : les bactériocytes (bc) qui hébergent les bactéries symbiotiques, les cellules à grains (cg) et les mucocytes (m). Chez cette espèce, la zone intermédiaire n'est pas distinguable en microscopie photonique.

Chaque filament comprend trois zones : une zone ciliée et une zone intermédiaire, toujours dépourvues de symbiotes ainsi qu'une zone latérale qui comprend les cellules hôtes. La

longueur de ces zones varie en fonction des espèces. La zone latérale se compose de quatre types cellulaires organisés en épithélium pseudostratifié autour de la lacune sanguine : les bactériocytes, les cellules intercalaires, les cellules à grains et les mucocytes (Frenkiel & Moueza, 1995; Gros *et al.*, 2011). D'après Frenkiel & Moueza (1995) :

-Les bactériocytes qui sont les cellules hôtes de la relation, sont les cellules majoritaires de la zone latérale. Elles possèdent un noyau basal d'environ 5  $\mu\text{m}$  de long. Leur volume cellulaire est essentiellement occupé par des bactéries envacuolées et les organites y sont peu nombreux. Le pôle apical présente des microvillosités qui augmentent le contact avec l'eau de la cavité palléale.

-Les cellules intercalaires s'intercalent entre les bactériocytes. Elles sont en forme de trompette avec un noyau apical. Le pôle apical présente de longues microvillosités tandis que le pôle basal, étroit, est dépourvu d'organites. Il a été proposé qu'elles produisent de nouveaux bactériocytes (Fiala-Médioni & Métivier, 1986; Reid & Brand, 1986). Il est également possible que ces cellules, qui recouvrent parfois partiellement les pôles apicaux des bactériocytes, servent à réguler la surface d'échange des cellules hôtes avec l'eau de la cavité palléale (Distel & Felbeck, 1987 ; Gros, 1997).

-Les cellules à grains possèdent un noyau basal d'environ 5  $\mu\text{m}$  de long. Elles possèdent de nombreux grains de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, répartis de manière homogène dans le cytoplasme. La nature exacte de ces grains reste à définir mais d'après Frenkiel & Mouëza (1995), il ne s'agit pas de protéoglycanes ou d'un mélange de glycoprotéines et de protéoglycanes mais plutôt de composés protéiques riches en ponts disulfures. Leur pôle apical est souvent recouvert par les bactériocytes. La fonction exacte des cellules à grains demeure inconnue, bien que ces auteurs leur supposent une fonction de détoxification des sulfures du fait de leur teneur en composés soufrés.

-Les mucocytes sont des cellules qui possèdent un noyau basal. Elles renferment du mucus et les organites présents sont surtout des appareils de Golgi. Ces cellules vont sécréter du mucus dans lequel seront piégées les particules. Ces cellules ont fait l'objet de quelques études (Beninger & St Jean, 1997 ; Beninger *et al.*, 1997). La présence de ces cellules, associée à celle de cils dans la zone frontale du filament implique un transport mucocilliaire des particules, sans doute destinées à la nutrition. Le mucus qui contient les particules est envoyé vers la surface frontale de la branchie, puis acheminé au niveau des palpes labiaux. Chez les Lucinidae les palpes labiaux sont réduits et la part de la nutrition associée à la filtration est

estimée à 20%. Le mucus de cette zone pourrait également servir de lubrifiant pour éviter que les filaments ne soient endommagés lors de leur contraction.

Bien qu'à ce jour, aucun lien n'ait été établi entre la composition de la zone latérale et la phylogénie des Lucinidae, cette zone présente une variabilité interspécifique. En effet, la présence d'hémoglobine, que l'on sait impliquée dans le transport de l'oxygène et du sulfure d'hydrogène, a été mise en évidence à l'intérieur des bactériocytes de quelques espèces : *Anodontia edentula* (Lebata, 2001), *Anodontia ovum* (Ball *et al.*, 2009), *Myrtea flabelliformis* (Brissac *et al.*, 2011), et *Phacoides pectinatus* (Fenkiel *et al.*, 1996). D'autre part, les cellules intercalaires de *Divaricella quadrisulcata*, présentent au niveau de leur pôle apical de longs cils qui semblent avoir un rôle sensoriel (Gros *et al.*, 2000). La présence des cellules à grains n'est pas systématique. Ce type cellulaire n'a été observé que chez quelques Lucinidae des genres *Codakia* (Frenkiel & Moueza, 1995), *Ctena* (Meyer *et al.*, 2008), *Divaricella* (Gros *et al.*, 2000), *Indoaustriella* (Glover *et al.*, 2008), *Lucinisca* (Taylor & Glover, 2006) et *Myrtea* (Brissac *et al.*, 2011). Enfin, l'abondance des mucocytes varie en fonction des espèces. Ils peuvent être absents de la zone latérale comme chez *Lucinoma aequizonata* (Distel & Felbeck, 1987 ; Duplessis *et al.*, 2004), voire même de tout le filament branchial comme chez *Myrtea spinifera* (Dando *et al.*, 1985 ; Brissac *et al.*, 2011).

Une étude récente menée sur *Codakia orbicularis* a montré que les individus maintenus pendant quatre mois au laboratoire en l'absence de nourriture et de sulfure, présentaient une diminution progressive des bactéries intracellulaires détectables par hybridation *in situ* (Caro *et al.*, 2009). Cette diminution s'accompagne de modifications dans l'organisation des filaments branchiaux. Après quatre mois de jeûne, les bactériocytes, qui constituaient les cellules majoritaires des filaments, sont relégués au second rang, laissant la place aux cellules à grains qui deviennent l'espèce cellulaire majoritaire de la zone latérale du filament branchial. Les bactéries sont toutefois encore détectables dans les bactériocytes.

Des études portant sur d'autres bivalves ont également montré une diminution des symbiotes chez les animaux privés de soufre. C'est le cas des Vesicomidae *Calyptogena kilmeri* et *C. pacifica* (Goffredi *et al.*, 2004), des Thyasiridae côtiers *Thyasira flexuosa* (Dufour & Felbeck, 2006), des Bathymodiolidae des sources hydrothermales, *Bathymodiolus azoricus* (Kádár *et al.*, 2005).

## 4. Objectifs de la thèse

### 4.1. Objectif 1 : Mise en évidence de la plasticité tissulaire du filament branchial des Lucinidae et compréhension des mécanismes sous-jacents

Le filament branchial des Lucinidae est constitué de plusieurs types cellulaires (bactériocytes, cellules à grains, cellules ciliées eulatérales, cellules ciliées frontales, cellules intercalaires, mucocytes...) caractérisés par leur position, leur taille, leur forme, et / ou leur activité (accueil des symbiotes, sécrétion...). Bien que très organisé, ce système n'est pas figé. Comme cela a été montré chez les juvéniles en développement (Gros *et al.*, 1997) puis chez l'adulte (Caro *et al.*, 2009), l'organisation des cellules peut être modifiée en fonction du stade de développement ou du milieu de vie du bivalve. Cette extraordinaire capacité de réorganisation cellulaire de la zone latérale du filament branchial, que nous appellerons plasticité en référence à ce qui est observé dans le système nerveux, permet le développement du tissu et son adaptation aux conditions environnementales. Toutefois, les mécanismes qui sous-tendent la plasticité tissulaire restent flous.

Le même phénomène décrit chez *Codakia orbicularis* (Caro *et al.*, 2009) peut-il se produire chez d'autres espèces de Lucinidae ? Une partie de la réponse est apportée par Brissac *et al.* (2009) qui observent une diminution du nombre de bactéries détectables par hybridation *in situ* après un mois de jeûne chez une espèce du même genre, *Codakia orbiculata*. Mais ce phénomène se poursuit-il chez cette espèce si le jeûne est prolongé comme c'est le cas chez *Codakia orbicularis* ? Est-il possible de le poursuivre jusqu'à épuisement du stock de symbiotes, c'est-à-dire jusqu'à rendre les individus aposymbiotiques ? En d'autres termes, peut-il y avoir une décolonisation poussée des filaments branchiaux ? Plus intéressant encore, que se passe-t-il si des individus sans symbiotes apparents sont replacés dans leur milieu naturel, au contact des sulfures et des bactéries compétentes libres dans le sédiment ? Ce modèle s'applique-t-il à d'autres genres de cette famille ?

Les changements observés résultent-ils de la modification phénotypique des cellules du filament branchial ou de variations du nombre des cellules ? Par exemple, la diminution des

bactériocytes observables va-t-elle de pair avec une diminution de leur volume ou, est-elle liée à leur disparition ?

Pour savoir si ces modifications sont liées à une variation du nombre des cellules en fonction de l'environnement nous tenterons de :

1) mettre en évidence la mort cellulaire programmée par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) qui permet de repérer l'ADN fragmenté, ainsi que par détection immunohistochimique de la caspase 3, marqueur de l'apoptose.

2) mettre en évidence la prolifération cellulaire par détection immunohistochimique de la phospho-histone 3, marqueur de la mitose, et du BrdU (5-bromo-2-désoxyuridine), marqueur exogène de la prolifération cellulaire.

Pour ce faire, nous provoquerons la décolonisation des filaments branchiaux en maintenant les bivalves au laboratoire en les privant de soufre réduit et de nourriture. Une fois les bactéries indétectables, nous tenterons de provoquer la recolonisation des filaments par les bactéries en les réintroduisant dans leur milieu naturel.

Les individus issus des protocoles de décolonisation et recolonisation serviront de base aux expériences permettant la mise en évidence de la plasticité tissulaire du filament branchial des Lucinidae et la compréhension des mécanismes qui y sont liés.

Cette démarche expérimentale a été réalisée sur le modèle symbiotique *Codakia orbiculata* qui présente l'avantage d'être plus facile à collecter et à garder en laboratoire que *Codakia orbicularis*. Nous avons également réalisée ces expérimentations chez un autre Lucinidae, *Lucina pensylvanica*, présentant une organisation tissulaire différente, afin de comparer la plasticité tissulaire chez deux modèles différents. *Codakia orbiculata* (Montagu, 1808) est une espèce dont l'aire de répartition s'étend de la Caroline du Nord au sud de la Floride, en passant par les Bermudes. Elle se rencontre également des Antilles au Brésil (Abbott, 1974). En Guadeloupe, cette espèce est inféodée aux herbiers de Magnolophytes marines. *Lucina pensylvanica* (Linné, 1758) est présente de la Caroline du Nord au sud de la Floride ainsi que dans les Antilles (Abbott, 1974). Bien que présente en Martinique, cette espèce n'est pas rencontrée en Guadeloupe. Elle se rencontre à proximité des herbiers de Magnolophytes marines. Peu d'études se sont intéressées aux sédiments de ces herbiers, cependant les travaux de thèse de Maurin (2009), font mention de concentrations en H<sub>2</sub>S allant de 10 µM à 30 µM.

## 4.2. Objectif 2 : Etude de l'acquisition des symbiotes

En travaillant à partir d'individus décolonisés, chez lesquels les bactéries symbiotiques sont indétectables par hybridation *in situ*, remis dans leur milieu naturel, nous nous intéresserons au mode d'acquisition des symbiotes, afin d'apporter des éléments permettant d'étayer l'hypothèse d'une acquisition environnementale des symbiotes chez *C. orbiculata*. Des analyses immunohistochimiques nous permettront de mettre en évidence l'actine, protéine impliquée dans l'endocytose de bactéries.

Parallèlement à cela, nous tenterons de savoir si les bactéries, acquises de l'environnement, sont capables de se multiplier massivement à l'intérieur des bactériocytes, de rares figures de divisions ayant déjà été observées dans ce type cellulaire chez *Codakia orbicularis* (Frenkiel & Moueza, 1995).

## 4.3. Objectif 3 : Mise en évidence de la plasticité des symbiotes bactériens

L'étude des symbiotes bactériens de *Codakia orbicularis* a montré l'existence de sept sous-populations différenciables par leur taille et leur contenu génomique (Caro *et al.*, 2007). Le jeûne entraîne une diminution de la taille des symbiotes et une variation de leur contenu génomique (Caro *et al.*, 2009). Le même phénomène existe-t-il chez un Lucinidae du même genre et chez d'autres genres de Lucinidae ? Pour y répondre nous effectuerons des analyses de cytométrie en flux chez un Lucinidae du même genre, qui occupe le même habitat et qui semble présenter un schéma de décolonisation similaire (*Codakia orbiculata*). Nous effectuerons également ces analyses chez un Lucinidae du genre *Lucina* vivant dans un habitat un peu différent, en proximité d'herbier (*Lucina pennsylvanica*).

Les analyses réalisées chez *Codakia orbicularis* ont également montré une relation entre la taille des symbiotes et leur contenu en soufre, sans toutefois étudier les conséquences du jeûne sur ce paramètre. Nous tenterons donc de compléter ces résultats en caractérisant le contenu en soufre élémentaire de la branchie durant la décolonisation des filaments branchiaux par la spectrométrie de fluorescence X.

Que se passe-t-il au niveau des symbiotes quand ils intègrent la branchie ? Pour le savoir, les mêmes analyses seront menées sur des individus recolonisés.

Ainsi, cette approche expérimentale nous permettra de mieux comprendre des processus qui interviennent tout au long de la vie des individus mais qui, trop subtiles pour être détectables chez un individu directement prélevé de son environnement, sont amplifiés et révélés par les expériences de décolonisation et de recolonisation du filament branchial, menées au laboratoire.

## **5. Organisation du manuscrit**

L'organisation du manuscrit suit les trois objectifs que nous venons de définir. Dans le chapitre 2, intitulé « Etude de la plasticité tissulaire et cellulaire chez l'hôte », nous traiterons de la mise en évidence de la plasticité du filament branchial des Lucinidae et des mécanismes qui y sont liés. Dans le chapitre 3, intitulé « Etude du mode d'acquisition des symbiotes et de leur plasticité », nous nous intéresserons à l'acquisition des symbiotes ainsi qu'aux modifications intrinsèques des bactéries associées aux changements des conditions environnementales. Enfin, le chapitre 4 sera consacré au développement de la conclusion et des principales perspectives que nous avons identifiées.

**CHAPITRE 2 : ETUDE DE LA  
PLASTICITE TISSULAIRE ET  
CELLULAIRE CHEZ L'HOTE**



# I. Matériel et méthodes

## 1.1. Matériel biologique

Notre étude a été réalisée sur les modèles biologiques *Codakia orbiculata* (Montagu, 1808) (Fig. 7A) et *Lucina pensylvanica* (Linné, 1758) (Fig. 7B).

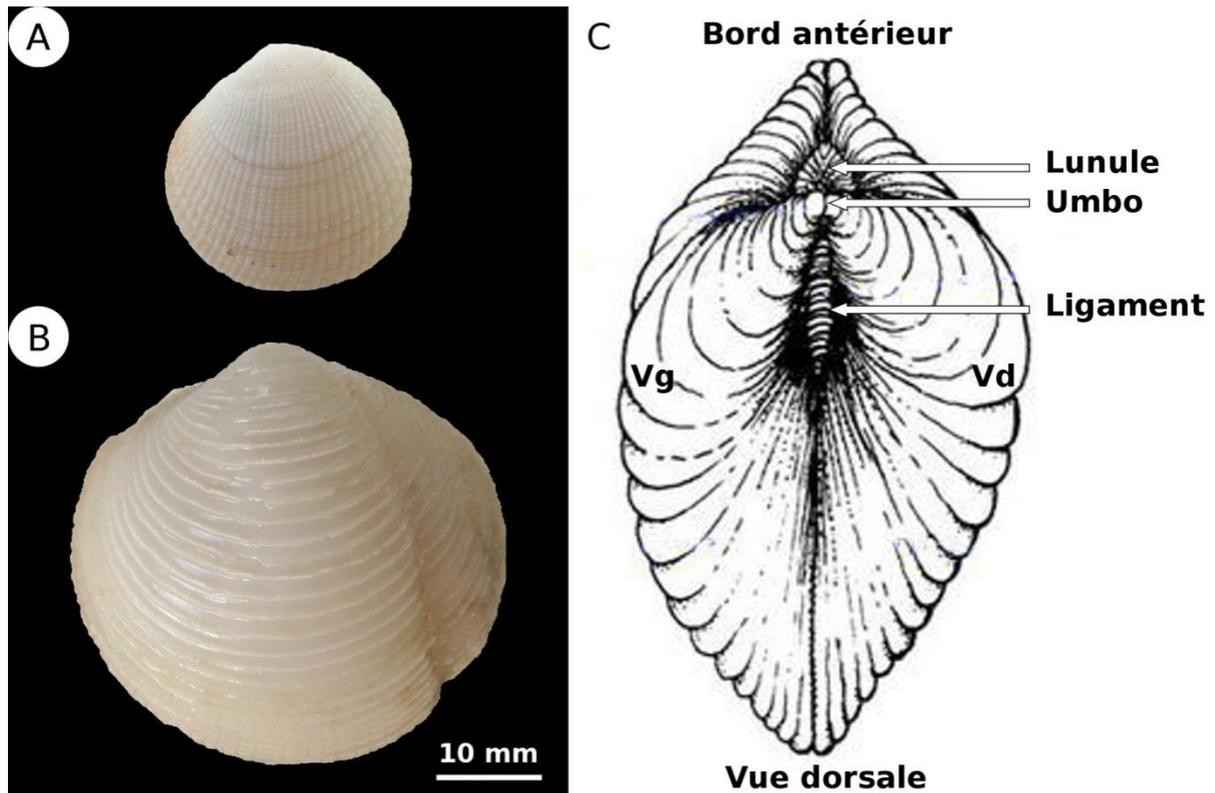


Figure 7 : Coquilles de bivalves.

**A** : Valve gauche de *Codakia orbiculata* ; **B** : Valve gauche de *Lucina pensylvanica*. **C** : schéma d'une coquille de bivalve (Illustration : Ivy Livingtone) ; Vg : valve gauche ; Vd : valve droite.

Chez *C. orbiculata*, les deux valves orbiculaires sont ornées de côtes radiales prononcées qui croisent des stries de croissance. Elles sont légèrement bombées et revêtent une couleur blanche à jaunâtre à l'extérieur et jaunâtre à l'intérieur. La coquille présente une lunule en forme de cœur. Cette espèce peut atteindre 20 à 25 mm de longueur antéro-postérieure. Elle se retrouve communément enfouie dans les premiers centimètres du sédiment (Allen, 1958 ; Taylor *et al.*, 2006) des herbiers de Guadeloupe et de Martinique. Son aire de répartition s'étend de la Caroline du Nord au Brésil en passant par les Antilles.

Chez *L. pensylvanica* (communément appelé soudon en Martinique), les deux valves sont très bombées, blanches à l'extérieur comme à l'intérieur. Elles sont ornées de stries de croissance marquées. La coquille présente une lunule en forme de cœur, surélevée en son centre. Cette espèce se caractérise par un sillon prononcé qui va de l'umbo jusqu'au bord ventral dans la région postérieure. Elle mesure généralement entre 25 et 50 mm de longueur antéro-postérieure. On la retrouve dans le sédiment sableux, à proximité des herbiers. Son aire de répartition est identique à celle de *C. orbiculata*, toutefois elle semble inexistante en Guadeloupe.

Ces deux espèces sont associées aux sédiments sablo-vaseux faiblement réduits des herbiers à *Thalassia testudinum*. Elles hébergent, au sein de leurs branchies, des bactéries endosymbiotiques sulfo-oxydantes de la subdivision gamma des Protéobactéries (Durand & Gros, 1996a; Durand *et al.*, 1996).

## 1.2. Collecte des échantillons

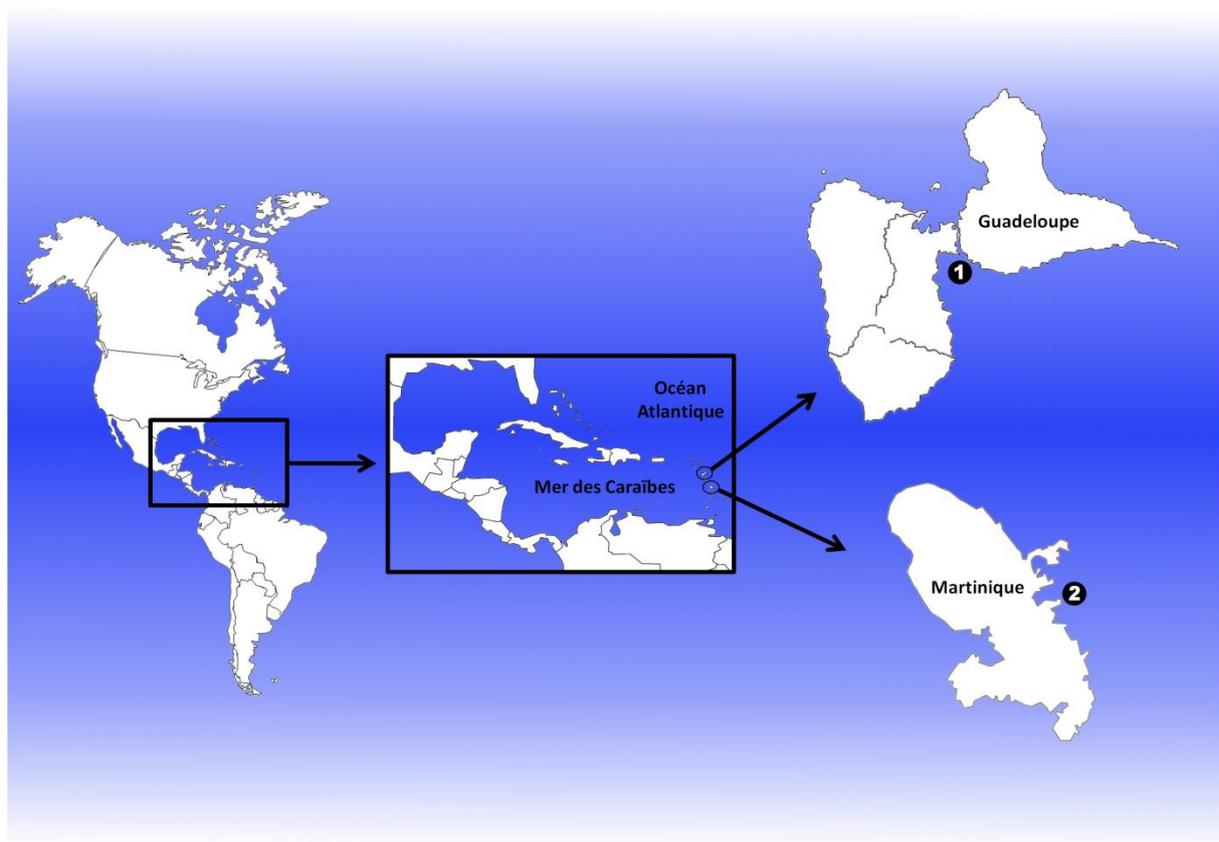


Figure 8 : Carte de localisation des sites de prélèvement.

1 : site de prélèvement de *Codakia orbiculata*. 2 : site de prélèvement de *Lucina pensylvanica*.

Les individus de l'espèce *C. orbiculata* ont été collectés dans l'herbier à *Thalassia testudinum* de l'îlet Cochon, situé au niveau du Petit Cul de Sac Marin, en Guadeloupe (Fig. 8). Les échantillonnages ont été effectués sur une période de 2 ans ont permis la constitution de 15 lots de 60 à 70 individus (Tableau 1).

**Tableau 1 : Récapitulatif des dates d'échantillonnage pour *Codakia orbiculata*.**

<b>Lot</b>	<b>Date d'échantillonnage</b>
1	15/09/08
2	15/10/08
3	15/11/08
4	15/12/08
5	01/02/09
6	01/04/09
7	01/07/09
8	01/09/09
9	01/11/09
10	01/12/09
11	15/02/10
12	01/04/10
13	01/05/10
14	01/08/10
15	01/10/10

Les individus de l'espèce *L. pensylvanica*, ont été collectés à proximité des herbiers à *T. testudinum* de la presqu'île du François, en Martinique (Fig. 8). Les échantillons ont été prélevés à deux reprises en 2009 (Tableau 2).

**Tableau 2 : Récapitulatif des dates d'échantillonnage pour *Lucina pensylvanica*.**

<b>Lot</b>	<b>Date d'échantillonnage</b>
1	01/05/09
2	15/11/09

### 1.3. Conditions expérimentales

Les individus *C. orbiculata* et *L. pensylvanica* prélevés sur le terrain sont, soit immédiatement sacrifiés (T<sub>0</sub>), soit placés en condition de jeûne.

Le protocole expérimental relatif à *C. orbiculata* est schématisé par la figure suivante (Fig. 9). :

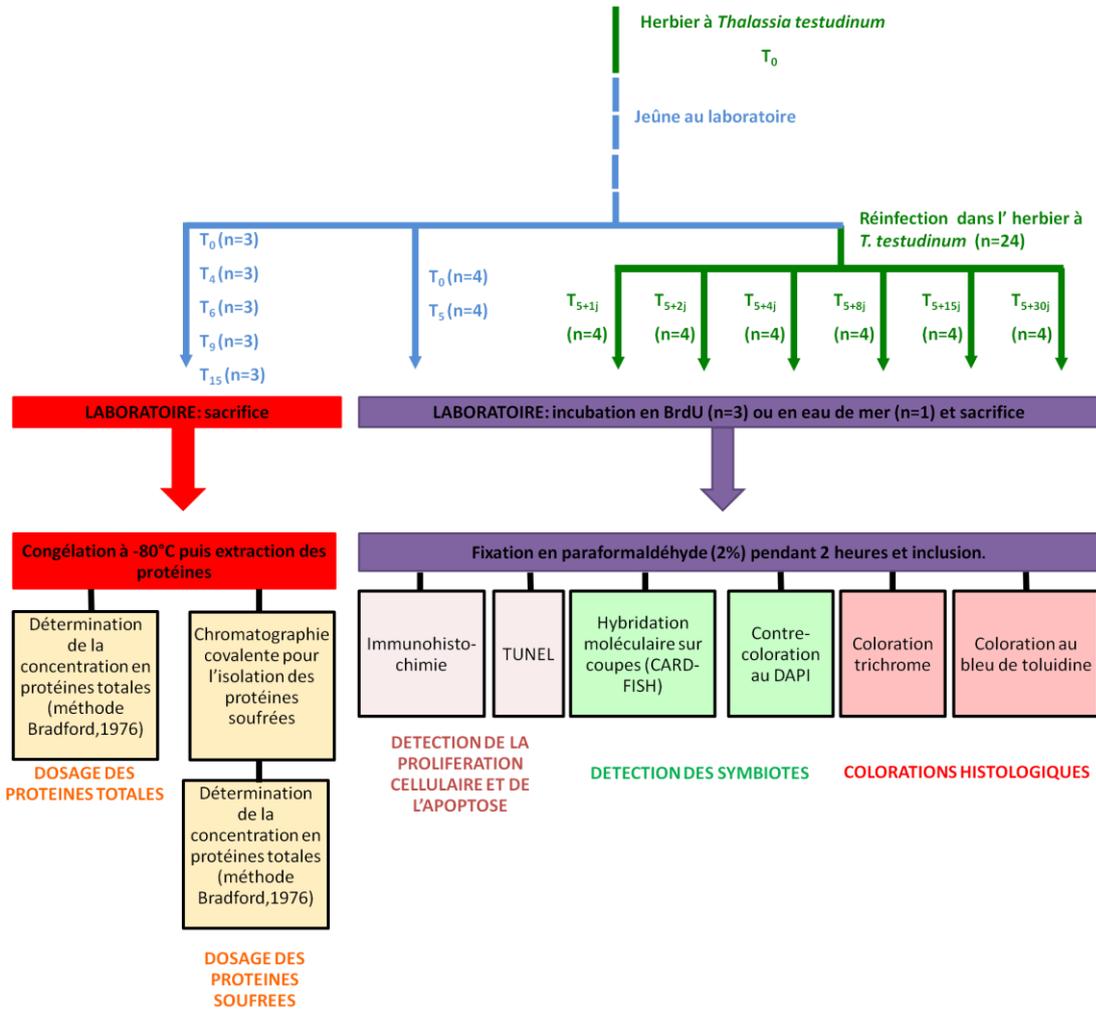


Figure 9 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en œuvre chez *Codakia orbiculata* dans l'étude de la plasticité tissulaire et cellulaire de l'hôte.

Les flèches vertes correspondent aux périodes de vie dans l'herbier, les flèches bleues correspondent aux périodes de jeûne en laboratoire. Le temps de jeûne est indiqué en mois (e.g. T<sub>6</sub>=6 mois de jeûne) et le retour dans l'herbier en mois de jeûne + jours dans l'herbier (e.g. T<sub>5+4j</sub>=5 mois de jeûne remis 4 jours dans l'herbier).

Le protocole expérimental relatif à *L. pensylvanica* est schématisé par la figure suivante (Fig. 10). :

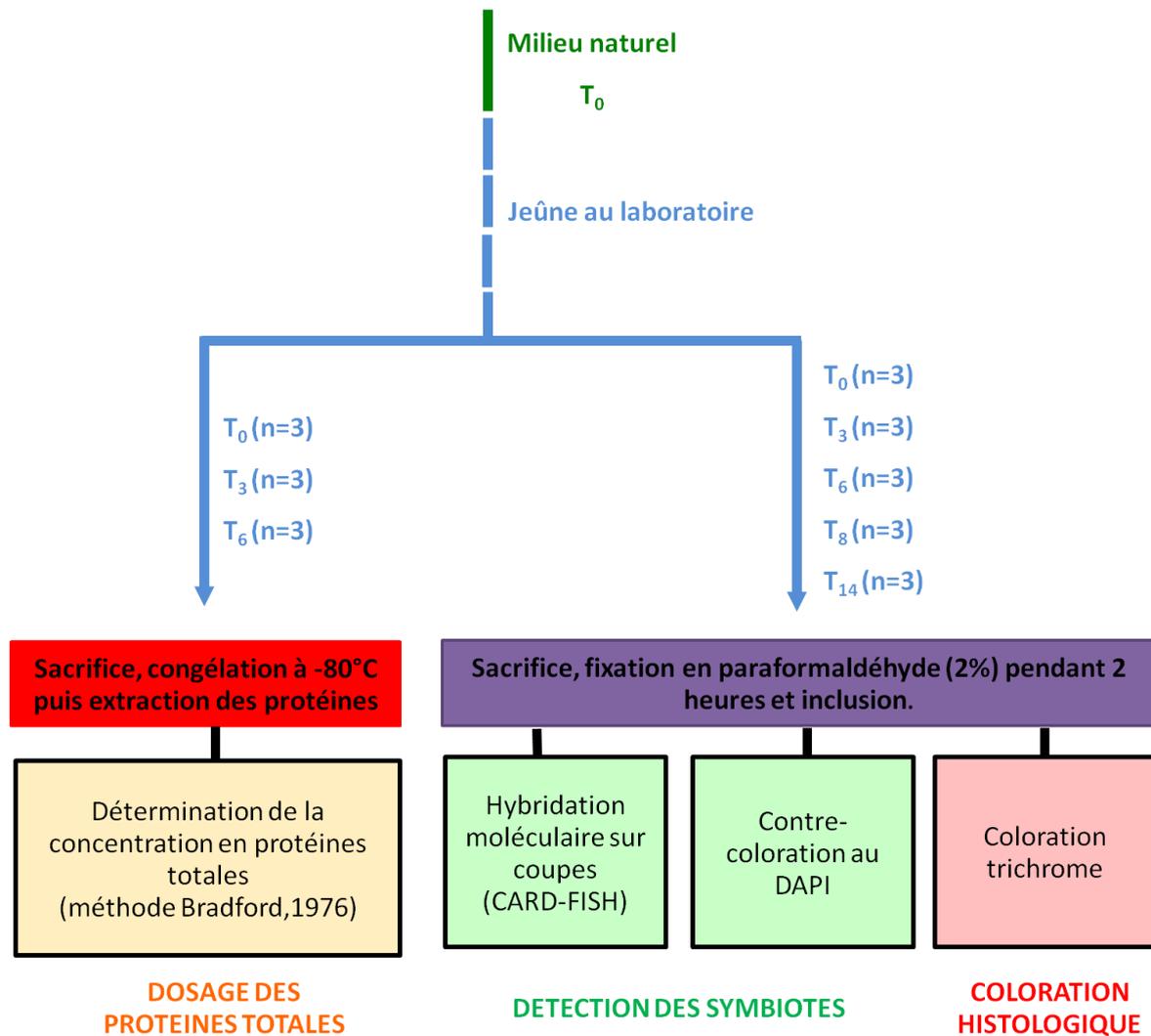


Figure 10 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en œuvre chez *Lucina pensylvanica* dans l'étude de la plasticité tissulaire et cellulaire de l'hôte.

Les flèches vertes correspondent aux périodes de vie dans l'herbier, les flèches bleues correspondent aux périodes de jeûne en laboratoire. Le temps de jeûne est indiqué en mois (e.g. T<sub>6</sub>=6 mois de jeûne).

### 1.3.1. Conditions de jeûne

Les individus placés en condition de jeûne sont maintenus dans des bacs d'eau de mer filtrée à 0,22 µm à 26°C. La filtration de l'eau de mer évite la contamination bactérienne et diminue la nutrition à partir de particules organiques, qui pourraient être présentes dans l'eau non filtrée, mais n'élimine pas les acides aminés et les particules organiques inférieures à 0,22 µm, dissoutes dans l'eau.

Les bacs sont équipés de bulleurs qui permettent l'oxygénation de l'eau en continu. Toutes les semaines, l'eau est changée, les bacs sont lavés, et les coquilles des bivalves sont brossées afin d'éviter le développement d'algues unicellulaires qui pourraient constituer une source de nourriture. Dans ces conditions expérimentales, une période maximale de 15 mois de jeûne a été imposée.

### 1.3.2. Conditions de réinfection

Après une période de jeûne de 5 mois ( $T_5$ ), certains individus de l'espèce *C. orbiculata* sont utilisés pour des expériences de réinfection. Ils sont prélevés de façon aléatoire dans les bacs de jeûne, séchés, puis peints afin d'éviter toute confusion avec les *C. orbiculata* naturellement présentes dans le sédiment. Ils sont ensuite remis dans leur biotope pour des durées allant de 1 à 30 jours ( $T_{5+1j}$  à  $T_{5+30j}$ ). Les individus colorés sont placés dans un enclos formé de grillage, dans l'herbier. Pour repérer rapidement chaque individu, leur site de réimplantation est marqué à l'aide d'une petite pique en bois. Afin de suivre l'évolution de la structure du filament branchial et des symbiotes, plusieurs délais de réinfection ont été analysés : 1 jour ( $T_{5+1j}$ ), 2 jours ( $T_{5+2j}$ ), 4 jours ( $T_{5+4j}$ ), 8 jours ( $T_{5+8j}$ ), 15 jours ( $T_{5+15j}$ ) et 30 jours ( $T_{5+30j}$ ). A chaque délai de réinfection, quatre individus sont collectés au hasard : trois d'entre eux serviront aux expériences de plasticité tissulaire après incubation en BrdU, le dernier servira aux expériences de plasticité tissulaire sans incubation en BrdU (témoin négatif).

## 1.4. Incubation en BrdU

Le 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU) est un nucléoside synthétique, analogue à la thymidine à laquelle il se substitue durant la réplication de l'ADN (Fig. 11) (Gratzner, 1982). L'uridine n'est pas une base retrouvée au sein de l'ADN. Lorsque le noyau se trouve enrichi en cette base par un apport exogène excessif, elle entre en compétition avec la thymidine, et est facilement incorporée en lieu et place de cette dernière. La présence de cette base particulière au sein des brins d'ADN néo-formés, permet leur détection par des techniques d'immunohistochimie. L'uridine sera retrouvée au sein des cellules filles issues de la division cellulaire ce qui fait d'elle un bon marqueur de la division cellulaire.

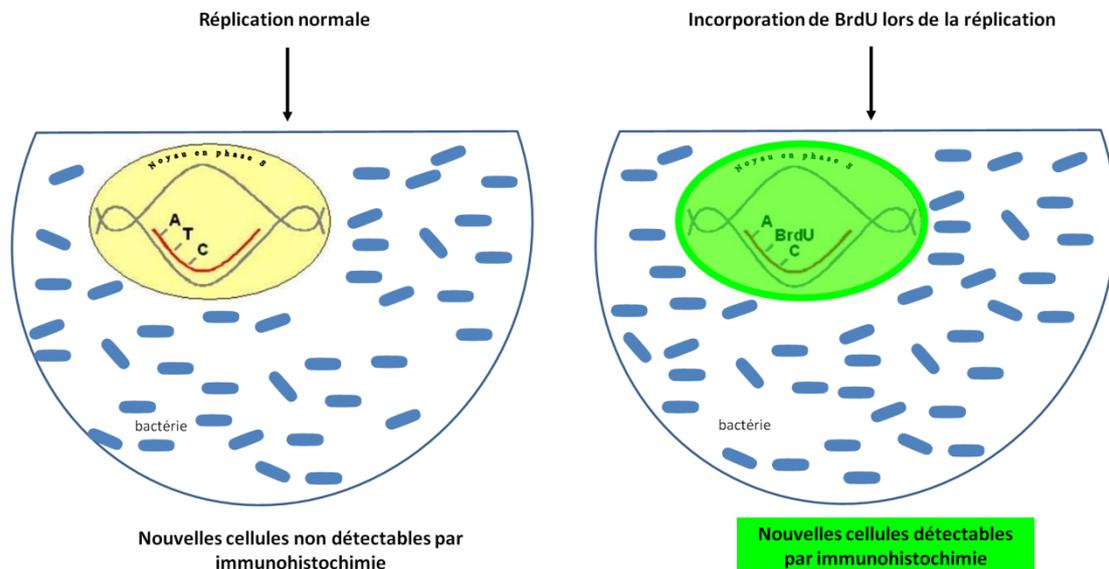


Figure 11 : Représentation schématique de l'incorporation du BrdU dans une cellule en phase S, cas d'un bactériocyte.

La détection immunohistochimique sur coupes du BrdU ayant permis de caractériser les cellules des moules *Mytilus galloprovincialis* (Martinez Exposito *et al.*, 1994; Gómez-Mendikute *et al.*, 2005; Zaldibar *et al.*, 2008), et l'incorporation du BrdU ayant été démontrée chez les moules du genre *Brachidontes* (Torreiro *et al.*, 1999), nous avons utilisé des moules entières du genre *Brachidontes*, facilement accessibles, comme témoin eucaryote. Elles ont incubé dans 50 ml d'une solution de BrdU (Sigma®) réalisée en eau de mer, à une concentration de 200 µg/ml, pendant 2 heures et 6 heures à température ambiante. Un témoin négatif a été obtenu en incubant l'individu dans 50 ml d'eau de mer filtrée à 0,22 µm. Les individus sont fixés en paraformaldéhyde (2%) pendant 3 heures à 4°C et inclus, soit pour l'immunohistochimie sur coupes classiques, soit pour l'immunohistochimie sur coupes à froid. Pour la réalisation de coupes à froid, les échantillons sont placés dans des bains de sucre de concentrations croissantes (10 %, 20 %, 30 %) réalisés en tampon phosphate 0,1 M à 4°C pendant 24 heures chacun. La congélation se fait en isopentane à -80°C pendant 1 heure. Les coupes sont réalisées au cryomicrotome.

Suite à l'obtention de témoins positifs, à partir de *Brachidontes*, deux temps d'incubation du BrdU ont été testés chez *C. orbiculata* : 2 et 6 heures. Les deux délais d'incubation ayant conduit à des résultats similaires, les individus issus du protocole de réinfection, ont incubé dans une solution de BrdU (Sigma®) comme indiqué pour les témoins positifs pendant 2 heures. Des témoins négatifs sont réalisés par incubation en eau de mer filtrée à 0,22µm.

## 1.5. Préparation des échantillons

### 1.5.1. Fixation et déshydratation

La fixation des échantillons doit être rapide. Elle permet entre autres, de préserver les tissus et les structures subcellulaires, en les protégeant de l'autolyse et des attaques bactériennes. Dans le cadre de la microscopie optique, elle se fait par le biais de fixateurs chimiques choisis en fonction du type d'observation envisagée, du degré souhaité de préservation des structures et des molécules à préserver. La fixation chimique permet la création de ponts entre les protéines qui deviennent alors insolubles dans l'eau et dans les solvants organiques. Ceci préserve également la structure de l'échantillon, par arrêt de l'activité enzymatique. Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser un agent fixateur de type aldéhyde : le paraformaldéhyde (PFA). Comme tous les aldéhydes, il permet une bonne fixation des protéines et des acides nucléiques mais, contrairement au glutaraldéhyde, c'est un monoaldéhyde qui ne crée pas de modification dans la conformation spatiale des protéines, ce qui en fait un bon fixateur pour l'immunohistochimie. Il a également l'avantage de pénétrer rapidement les échantillons (10 mm par heure).

La déshydratation, qui s'ensuit, a également une action de fixation mais elle permet surtout l'imprégnation des tissus dans des milieux d'inclusion non miscibles à l'eau. Les molécules non fixées, comme les lipides et le soufre élémentaire, sont éliminées lors de cette étape.

Les branchies sont fixées dans une solution de PFA diluée à 2 % dans de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm pendant 3 heures à 4°C, pour les techniques de CARD-FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization and CAlyzed Reporter Deposition), d'histologie et d'immunohistochimie.

Les échantillons sont ensuite rincés dans trois bains d'eau de mer filtrée à 0,22 µm de 10 minutes chacun, puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (30°, 50°, 70° et 95°) de 5 minutes chacun, et pour finir, dans 2 bains de 10 minutes d'éthanol absolu (100°). Les échantillons sont conservés dans l'éthanol absolu jusqu'à inclusion.

### 1.5.2. Inclusions et coupes

Trois milieux d'imprégnation et d'inclusion différents ont été utilisés : la paraffine, la résine de polyester (résine de Steedman) et la résine LR White (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des milieux d'inclusion utilisés.

Milieu d'inclusion	Technique d'analyse
Paraffine	Coloration histologique
Steedman	Coloration histologique Hybridation <i>in situ</i> Immunohistochimie
LR White	Coloration au bleu de toluidine

### *Inclusions en paraffine et coupes*

Les branchies fixées et déshydratées ne peuvent pas être directement incluses car la paraffine n'est pas miscible à l'alcool. Elles sont donc immergées dans trois bains de toluène de 10 minutes chacun. Le toluène est un liquide intermédiaire à la fois miscible à l'alcool et à la paraffine qui permet de remplacer l'alcool dans les tissus. L'imprégnation est ensuite réalisée en effectuant trois bains de paraffine liquide de 30 minutes chacun, à 60°C, afin d'éliminer totalement le toluène. Cette étape se fait dans une étuve sous vide, ce qui permet une meilleure pénétration de la paraffine. L'inclusion des échantillons est effectuée en coulant de la paraffine liquide entre deux barres de Leukart qui servent de moule d'inclusion. Les branchies sont rapidement placées dans ces moules. Une fois les blocs refroidis et la paraffine polymérisée, ils sont démoulés.

Des coupes fines de 5 µm d'épaisseur sont réalisées avec un microtome Leitz® 1516.

### *Inclusions en résine de polyester (résine de Steedman) et coupes*

L'utilisation de la paraffine n'ayant pas donné de résultats pour l'immuno-détection du BrdU, nous avons choisi de travailler avec une résine de polyester, car elle polymérise à température ambiante et risque moins de dénaturer le BrdU.

Les branchies fixées et déshydratées sont immergées dans des bains de résine de polyester de concentrations croissantes :

- Un premier bain contenant 50% de résine et 50 % d'éthanol absolu, durant 2 heures.
- Un deuxième bain de résine pure, durant 2 heures.
- Un troisième bain de résine pure, durant toute une nuit.

Toutes ces étapes se déroulent à 37°C, point de fusion de la résine de polyester. La polymérisation de la résine se fait à température ambiante.

Les coupes sériées sont réalisées au microtome comme décrit pour la paraffine au paragraphe précédent.

### *Inclusions en résine LR White et coupes*

La résine LR White présente l'avantage d'être plus dure et résistante à la coupe. Elle permet ainsi de réaliser des coupes plus fines à partir desquelles la structure fine des branchies peut être visualisée.

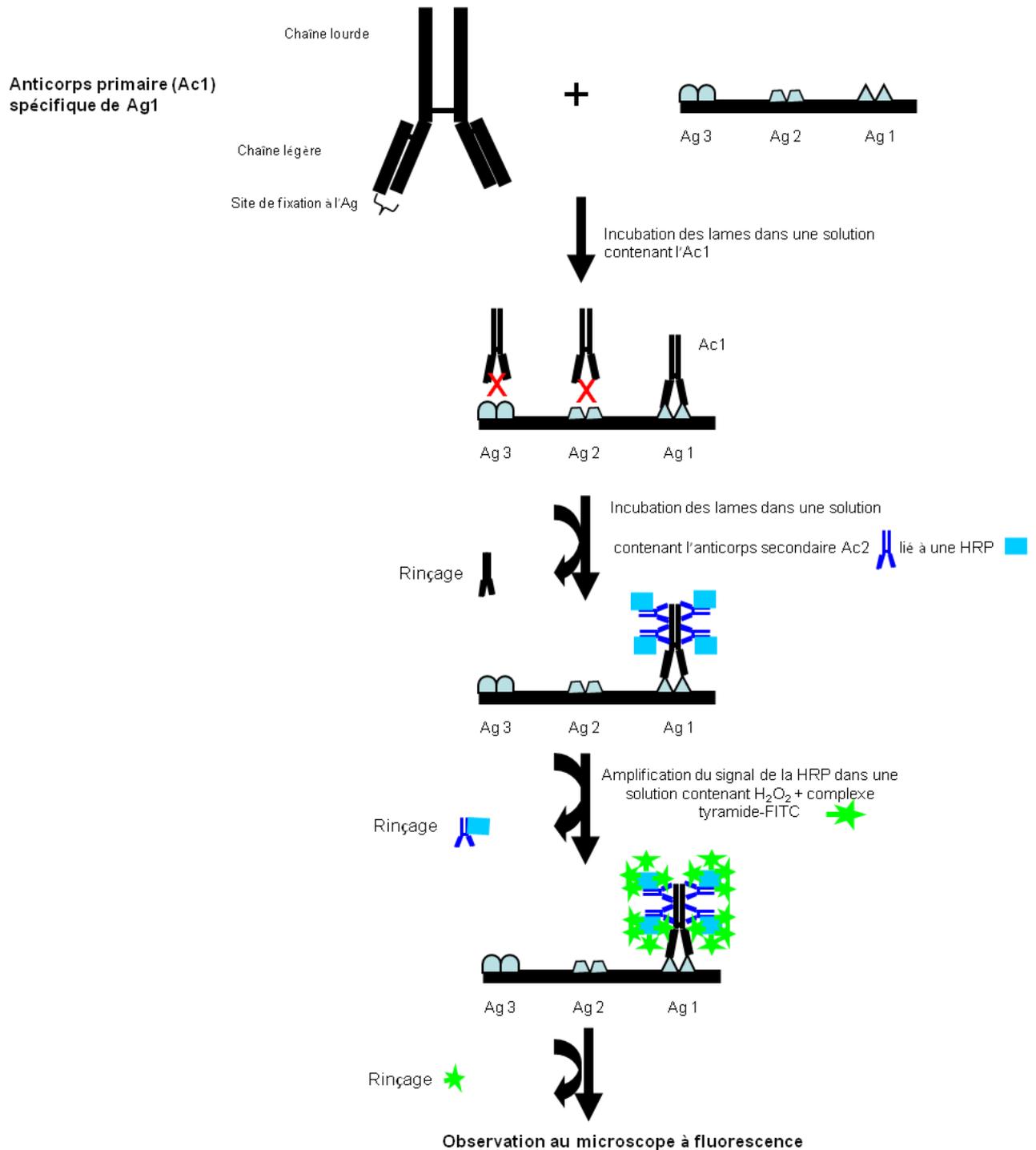
Les branchies fixées et déshydratées sont immergées sous vide, et à température ambiante, dans deux bains de résine LR White de 2 heures chacun, puis dans un troisième bain durant 12 heures. L'inclusion s'effectue en coulant de la résine liquide dans les puits d'un moule que l'on dépose dans une boîte à gants, saturée en argon ( $O_2=0,4$  ppm ;  $H_2O=5,3$  ppm), ou dans une enceinte hermétique contenant un générateur d'atmosphère anaérobie (bioMérieux<sup>®</sup> GENbox anaer) à 48°C, pendant 48 heures, afin de permettre la polymérisation de la résine. Des coupes semi-fines de 1  $\mu m$  d'épaisseur sont réalisées à l'aide de l'ultra-microtome Ultracut E (Reichert<sup>®</sup>). L'étalement et le collage des coupes se font à l'eau sur lames sylanisées.

## **1.6. Techniques de détection de la prolifération cellulaire**

La mise en évidence de la prolifération cellulaire a été faite par détection immunohistochimique du BrdU (Gratzner, 1982) dont l'incorporation a déjà été démontrée chez de nombreux mollusques appartenant notamment à la classe des Bivalves (Martinez Exposito *et al.*, 1994; Torreiro *et al.*, 1999; Gómez-Mendikute *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2008; Zaldibar *et al.*, 2008). Le BrdU étant un marqueur exogène de la prolifération cellulaire, nous avons complété la détection des nucléotides uraciles, intégrés à l'ADN par l'immunolocalisation d'un marqueur endogène de la mitose : la phospho-histone H3 (PH3) (Hendzel *et al.*, 1997). La détection immunohistochimique de la PH3 a déjà été réalisée chez plusieurs invertébrés (Ladurner *et al.*, 2000; Newmark & Sánchez Alvarado, 2000; Gschwentner *et al.*, 2001; Pflugfelder *et al.*, 2009).

### 1.6.1. Principe de l'immunohistochimie sur coupe

L'immunohistochimie est une technique qui permet la détection, à l'intérieur d'un tissu ou d'une cellule, d'un antigène donné (Fig. 12). L'antigène possède plusieurs épitopes qui sont des sites de liaison aux anticorps. Après une étape de perméabilisation membranaire facilitant le passage des anticorps, les préparations histologiques incubent en présence d'anticorps. Dans le cas de l'immunohistochimie directe, l'anticorps porte le fluorochrome (marqueur fluorescent). Dans le cas de l'immunohistochimie indirecte, le fluorochrome est porté par l'anticorps secondaire. C'est une technique qui permet d'avoir un meilleur rapport qualité signal détecté / bruit de fond.



**Figure 12 : Représentation schématique du principe de l'immunohistochimie indirecte sur coupe.**

Cette technique nécessite l'utilisation de deux anticorps. Le premier appelé anticorps primaire polyclonal ou monoclonal (Ac1) issu d'une espèce animale, se fixe de façon spécifique à l'antigène recherché (ici Ag1). L'anticorps primaire est ensuite révélé par un anticorps secondaire anti-espèce (Ac2) associé à un traceur (ici il s'agit d'un traceur fluorescent). Les rinçages successifs permettent l'élimination des anticorps et des complexes fluorescents en excès.

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques des différents anticorps utilisés au cours de ce travail pour la détection de la prolifération cellulaire (Tableau 4).

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour la détection de la prolifération cellulaire par immunohistochimie.**

P=polyclonal; M=monoclonal

<b>anticorps primaire</b>	<b>type</b>	<b>dilution</b>	<b>anticorps secondaire</b>	<b>type</b>	<b>dilution</b>	<b>Couleur du signal</b>
anti-BrdU (Molecular Probes®)	M	1/20	–		–	Vert
anti-phospho-histone H3 (Millipore®)	P	1/200	anti-lapin (Stressgen®)	P	1/200	Vert

### 1.6.2. Protocole d'immunolocalisation de la phospho-histone H3.

Les coupes sont déparaffinées et réhydratées. Elles pré-incubent ensuite pendant 2 heures, à température ambiante, dans une solution-tampon de PBS (Phosphate-Buffered Saline) à 0,1 M contenant 2 % de BSA ou Bovine Serum Albumin (blocage des sites de liaisons non spécifiques), et 0,3 % de Triton X-100 (perméabilisation des membranes afin de faciliter la pénétration des anticorps). Vient ensuite une étape d'incubation en présence de l'anticorps primaire, pendant au moins 2 heures, à température ambiante. Puis, l'excès d'anticorps primaire est rincé dans deux bains successifs de 10 minutes de PBS à 0,1 M. Les coupes incubent ensuite en présence de l'anticorps secondaire pendant 1 heure, à température ambiante. L'élimination de l'excédent en anticorps secondaire se fait par rinçages successifs de 10 minutes chacun dans du PBS 0,1 M. Le signal de l'enzyme Horseradish peroxydase (HRP), couplé à l'anticorps secondaire, est amplifié à l'aide de la tyramide, couplée à un fluorochrome Fluorescein Isothiocyanate (FITC,  $\lambda_{em}=494$  nm), (1 ml tampon d'amplification contenant 10  $\mu$ l d'eau oxygénée et 2  $\mu$ l de tyramide-fluorochrome), pendant 15 minutes, à 37°C, et à l'obscurité. La tyramide est un composé phénolique, substrat de la HRP, qui réagit rapidement en présence d'espèces réactives de l'oxygène, dérivées de l'eau oxygénée, au niveau du site de liaison de l'anticorps conjugué à la peroxydase. Les coupes sont enfin

rincées dans du PBS 0,1 M pendant 10 minutes, dans de l'eau distillée pendant 1 minute puis à l'éthanol à 95% pendant 1 minute.

### 1.6.3. Protocole d'immunolocalisation du BrdU dans les cellules eucaryotes

Les coupes issues des expériences d'incubation en BrdU sont déparaffinées et réhydratées. Pour ce protocole, l'étape de pré-incubation en PBS dure 5 heures. Elle est suivie d'un bain de Tris-Proteinase K à 0,5 µg/ml de 5 minutes à 37°C. Les coupes sont rincées en HCl 0,1 N sur glace pendant 10 minutes avant d'incuber en HCl 2 N pendant 1 heure. Après rinçage les coupes ont incubé en présence de l'anticorps primaire, pendant 2 heures, à température ambiante. Les coupes sont ensuite rincées dans du PBS 0,1 M pendant 10 min, dans de l'eau distillée pendant 1 minute puis à l'éthanol à 95% pendant 1 minute avant d'être montées entre lames et lamelles.

## 1.7. Techniques de détection de l'apoptose : mort cellulaire

La mise en évidence de la mort cellulaire a été effectuée par localisation de l'ADN fragmenté par la méthode TUNEL (Gavrieli *et al.*, 1992) complétée par la détection immunohistochimique de la caspase 3, enzyme clé de l'apoptose.

### 1.7.1. Protocole de localisation de l'ADN fragmenté (TUNEL)

Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée pour mettre en évidence l'apoptose. Elle a été décrite par Gravieli *et al.* en 1992.

Au cours de l'apoptose, il y a fragmentation de l'ADN, ce qui produit des segments avec à la fois, une extrémité 5'-P libre et une extrémité 3'-OH libre. De nouveaux nucléotides peuvent se fixer aux extrémités 3'OH, c'est pourquoi il est possible de les repérer en y fixant des désoxyuridine triphosphate (dUTP) marqués. La fixation de ces nucléotides marqués se fait via la deoxynucleotidyl Transferase (TdT). Ainsi, les cellules en apoptose, qui contiennent de nombreuses extrémités 3'OH, pourront être détectées.

Pour mettre en évidence l'ADN fragmenté, nous avons utilisé le « *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* » (Roche®). Après déparaffinage et réhydratation, les coupes incubent dans la Protéinase-K (20 µg/ml en Tris-HCl 20 mM) 20 minutes à 37 °C. Puis elles sont rincées trois fois 10 minutes en PBS 0,1 M. Les coupes incubent ensuite dans 50 µl du mélange TUNEL, contenant l'enzyme TdT et les nucléotides dUTP en tampon. Cette étape dure 1 heure et se fait en chambre humide à 37 °C. Les témoins positifs sont obtenus en incubant les coupes en DNase I recombinant, grade I (3000 U/ml– 3 U/ml from Roche® dans 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA) pendant 10 minutes entre 15 et 25 °C. Cette étape induit la fragmentation de l'ADN indispensable au marquage. Les témoins négatifs sont obtenus en incubant les coupes dans une solution contenant les nucléotides dUTP et ne contenant pas l'enzyme TdT.

### 1.8. Protocole d'immunolocalisation de la caspase 3

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques de l'anticorps utilisé au cours de ce travail pour la détection de l'apoptose (Tableau 5).

**Tableau 5 : Tableau récapitulatif des caractéristiques de l'anticorps utilisé pour la détection de l'apoptose par immunohistochimie.**

M=monoclonal

anticorps primaire	type	dilution	anticorps secondaire	type	dilution	Couleur du signal
anti-caspase 3 (R&D systems®)	P	1/1000	anti-lapin (Stressgen®)	P	1/200	Jaune

Les coupes, déparaffinées et réhydratées, subissent le même protocole que celui décrit pour l'immunolocalisation de la phospho-histone 3 avec les anticorps présentés dans le tableau 5.

Le foie de rat (*Rattus norvegicus*) a été sélectionné comme témoin positif car présentant un taux satisfaisant de cellules positives à la caspase 3.

## 1.9. Techniques de détection des symbiotes

### 1.9.1. Hybridation *in situ*

Les techniques d'hybridation moléculaire *in situ* permettent la détection au sein d'une cellule d'une séquence d'acide nucléique donnée grâce à l'utilisation d'une sonde spécifique. Ces sondes sont dites oligonucléotidiques, quand elles ont une taille proche de 20 nucléotides, et polynucléotidiques, quand elles font plus de 50 nucléotides.

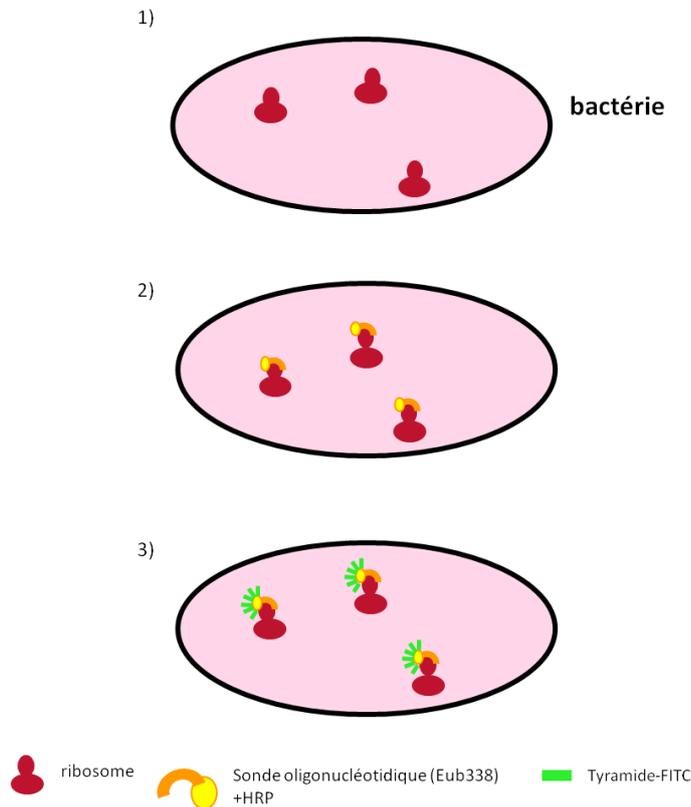
Ces techniques reposent sur la capacité qu'ont les acides nucléiques monobrinés à s'associer de façon spécifique et réversible à leurs répliques complémentaires, par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes (liaisons faibles). Les hybrides formés peuvent être de type ARN/ARN, ARN/ADN ou ADN/ADN.

#### *Principe du CARD-FISH*

L'hybridation moléculaire *in situ* (Fig.13) utilise des sondes marquées par un fluorochrome, afin de repérer des éléments cellulaires cibles, tels les ribosomes. Dans ce cas, on utilise une sonde oligonucléotidique capable de s'hybrider à l'ARNr. En écologie microbienne, il s'agit généralement de sondes spécifiques de l'ARNr 16S des procaryotes.

Après réhydratation des coupes, les membranes sont perméabilisées grâce à la protéinase K pour permettre le passage de la sonde. L'hybridation doit se faire dans des conditions de stringence optimales, c'est-à-dire en respectant les conditions de température, de pH et de concentration en sels des tampons qui permettent l'appariement des séquences nucléiques. La stringence est proportionnelle à la température et inversement proportionnelle à la concentration en cations monovalents ( $\text{Na}^+$  par exemple). Ainsi, plus la stringence sera élevée, plus l'hybridation sera difficile, mais plus elle sera spécifique. Pour respecter ces conditions, la température doit être inférieure de 5 à 10°C à la température de fusion  $T_m$  (température à laquelle 50% des fragments sont sous forme monobrin).

L'utilisation de formamide permet d'abaisser la température d'hybridation par affaiblissement des liaisons hydrogènes. Pour chaque pourcent de formamide ajouté, la température est abaissée de 0,65°C pour l'ADN et de 0,72°C pour l'ARN.



**Figure 13 : Représentation schématique du principe de la technique CARD-FISH appliquée à la bactériologie.**

Les symbiotes bactériens possèdent des ribosomes représentés schématiquement ici en rouge (1). La séquence 3'-CGU CGG UGG GCU TCC TCU-5' de l'ARNr 16S de ces procaryotes va être la cible d'une sonde oligonucléotidique d'ADN de séquence 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'. Cette sonde est couplée à l'enzyme Horseradish peroxydase (HRP) (2). En présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase catalyse le dépôt de plusieurs molécules de tyramide couplées au fluorochrome FITC permettant ainsi l'amplification du signal (3).

Le signal fournit lors de la révélation peut être faible chez les cellules contenant peu de ribosomes. Pour pallier cela, on applique un protocole CARD-FISH, dans lequel les sondes sont couplées à une HRP que l'on fait reconnaître par son substrat : la tyramide. Pour détecter le signal, on couple un fluorochrome (ici le FITC) à la tyramide.

La sonde utilisée pour ce travail est la EUB 338 III de séquence : 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' (Amann *et al.*, 2001). C'est une sonde spécifique de l'ARNr 16S des bactéries.

### *Protocole*

Les échantillons ont été traités selon le protocole de Pernthaler *et al.* (2002). Après déparaffinage et réhydratation, les membranes sont perméabilisées en effectuant un bain de HCl 0,2 M de 12 minutes, un bain de Tris-HCl 20 mM de 10 minutes, un bain de Tris-

Protéinase K à 0,5 µg/ml en Tris-HCl 20 mM, pendant 5 minutes à 37°C puis un bain de Tris-HCl 20 mM de 10 minutes.

Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée, et séchées à l'air libre. L'inhibition des peroxydases endogènes se fait par incubation des coupes en HCl 0,01 M pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite rincées en PBS 0,1 M, puis à l'eau distillée et enfin séchées à l'air libre. La digestion enzymatique des membranes bactériennes se poursuit par incubation des coupes dans une solution de lysozyme à 10 mg/ml de TE, pendant 1 heure. Elle est suivie par l'hybridation des amorces à 50 ng/µl à 46°C pendant 2 à 3 heures. A la fin de l'hybridation, les lames sont rincées dans un tampon de lavage 10 minutes à 48°C puis au PBS 0,1 M, pendant 15 minutes. L'amplification du signal de la HRP se fait par incubation des lames dans une solution de tampon d'amplification contenant de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la tyramide-FITC, pendant 15 minutes, à l'obscurité. Une fois sèches, les coupes sont montées entre lames et lamelles dans un milieu de montage pour les observations au microscope à fluorescence.

### 1.9.2. Marquage de l'ADN au DAPI

Une autre approche a consisté à utiliser des marqueurs d'ADN et d'ARN pour révéler les symbiotes.

Le DAPI ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole, est un marqueur fluorescent des acides nucléiques, capable de se lier fortement aux nucléotides dG-dC de l'ADN et rA-rU de l'ARN par intercalation. Il peut également se lier, sans s'intercaler, à des séquences du petit sillon de l'ADN, riches en A-T (3-4 pb consécutives) pour former des complexes de plus forte fluorescence (Kapusinski, 1995). Une fois complexé aux acides nucléiques, son excitation par les UV ( $\lambda$  max = 358 nm) permet l'émission d'un signal bleu ( $\lambda$  max = 461 nm).

Afin de mettre en évidence les acides nucléiques, les milieux de montage de toutes les lames issues des protocoles d'immunohistochimie et de CARD-FISH ont été complétés par du DAPI (100 µg/ml).

## 1.10. Techniques de coloration histologique

### 1.10.1. Coloration histologique trichrome

Des colorations trichromes ont été réalisées sur des coupes déparaffinées et réhydratées selon le protocole établi par Gabe (1968).

Les coupes sont immergées dans du bleu alcian (pH=2,5) pendant 30 minutes, puis rincées à l'eau courante pendant 4 minutes. Ce traitement permet de colorer en bleu les mucopolysaccharides (ou protéoglycanes). Les coupes incubent ensuite dans de l'Hématoxyline de Groat (l'Hématoxyline de Groat 0,5‰, acide sulfurique 0,8%, alun de fer 1%, alcool 95° 50%) pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau courante pendant 2 minutes. La coloration est fixée par un bain de carbonate de lithium pendant 2 minutes, avant rinçage à l'eau courante pendant 1 minute. Avec ce traitement, les noyaux des cellules sont colorés en noir.

Les coupes sont ensuite immergées dans un bain d'Orange G à 2% dans une solution d'acide phosphomolybdique à 1% pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau acétifiée à 1% pendant quelques secondes. Ce traitement induit une coloration en orange des protéines acidophiles. Enfin, les coupes incubent dans de la Fuch sine Ponceau (Fuch sine à 0,33‰, Ponceau à 0,66‰ et acide acétique 2‰) qui colore en rose les protéines acidophiles, mais qui sert surtout ici à avoir un contraste de fond. Après coloration, les coupes sont déshydratées (alcool 100°, alcool butylique), passées en toluène, puis montées entre lames et lamelles.

### 1.10.2. Coloration au bleu de toluidine

Les coupes semi-fines sont directement colorées au bleu de toluidine dans du tampon Borax à 1% qui colore les structures basophiles (noyaux, cytoplasmes...) avec une intensité qui varie selon la richesse en acides nucléiques. Il permet d'obtenir un contraste de fond.

## 1.11. Observations

Les coupes issues des protocoles d'immunohistochimie et de CARD-FISH sont montées entre lames et lamelles dans un milieu de montage (Fluoprep<sup>®</sup>, tamponné au PBS 0,1 M et auquel a été ajouté du 4'6-diamino-2-phenyllindole dihydrochloride (DAPI) à 100 µg/ml) pour les observations au microscope à fluorescence. Les lames sont conservées à l'obscurité, et à 4°C, jusqu'à utilisation.

L'observation des lames se fait grâce à un microscope Nikon<sup>®</sup> Eclipse 80i, auquel est associée une caméra CCD Nikon<sup>®</sup> DXM 1200F. Le microscope est utilisé en mode épifluorescence pour les coupes issues des protocoles d'immunohistochimie et de CARD-FISH.

## 1.12. Techniques de dosages des protéines

### 1.12.1. Extraction des protéines

Pour chaque échantillon, on procède à l'extraction des protéines en broyant 20 mg de tissu frais dans 500 µl de tampon de lyse (Triton 100X, NaCl 2,5 M, « Protease inhibitor cocktail » P840 Sigma<sup>®</sup>, Tris-EDTA stérile). L'ensemble incube 30 minutes, à 4°C, puis est centrifugé à 13000 g pendant 30 minutes, à 4°C. Le surnageant est récupéré, réparti en aliquotes de 100 µl et stocké à -80°C avant analyse.

### 1.12.2. Dosage des protéines totales

Une dilution au 1/1000 est réalisée à partir d'une aliquote de 100 µl de surnageant. 1 ml de cette dilution incube avec 1 ml de réactif de Bradford (Sigma<sup>®</sup>), pendant 20 minutes à température ambiante, et l'absorbance est lue à 595 nm.

Les concentrations en protéines des différents extraits, sont déterminées selon la méthode de Bradford (1976). Il s'agit d'un dosage colorimétrique utilisant le colorant bleu de Coomassie, également appelé Blue Brillant G, dont l'absorbance maximale se situe à 465 nm. En présence de protéines, ce colorant se lie aux acides aminés arginine (ARG), phénylalanine (PHE), tryptophane (TRP), et proline (PRO), provoquant un déplacement de son absorbance maximale à 595 nm. Les concentrations sont déterminées avec l'albumine bovine (BSA) prise comme protéine de référence (gamme étalon : 0 à 10 µg/ml).

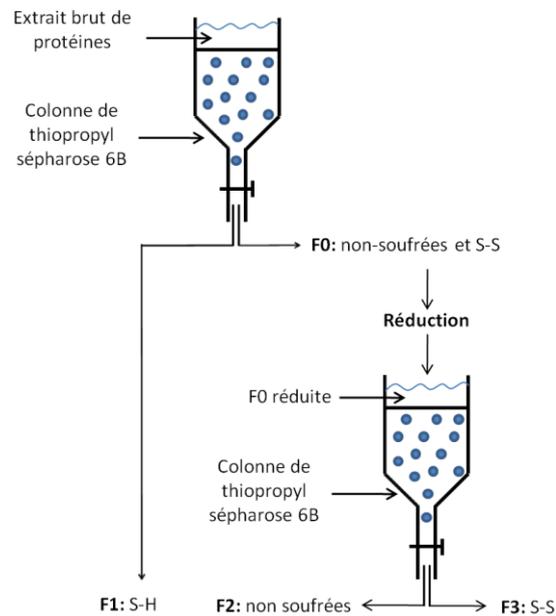
### 1.12.3. Dosage des protéines soufrées

#### *principe*

Le dosage des protéines soufrées se fait par chromatographie covalente. Il s'agit d'une technique d'adsorption sélective dans laquelle les protéines à isoler sont liées de façon covalente et réversible à l'adsorbant. Ici, il s'agit d'un gel de thiopropyl-agarose (Agarose-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-SH).

#### *protocole*

Le protocole du dosage des protéines soufrées, adapté de Laycock *et al.* (1989), est synthétisé par la figure 14.



**Figure 14 : Dosage des protéines soufrées.**

100  $\mu$ l de surnageant issus de l'extrait brut des protéines sont déposés sur la colonne. La colonne est alors éluée par du tampon 1 (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2). Les protéines non adsorbées (protéines non soufrées et protéines contenant des ponts disulfures S-S) sont recueillies et constituent la fraction F0 (protéines activables par réduction).

La colonne est ensuite éluée par du tampon 2 (DTT 1M, Cystéine 20 mM dans du tampon 1). Les protéines adsorbées (protéines soufrées actives contenant des groupements SH) sont regroupées sous forme de fractions. L'éluat est déposé sur une colonne SEPHADEX<sup>®</sup> G50 éluée au tampon 1 afin d'éliminer la cystéine. Les protéines non adsorbées constituent la fraction F1 (protéines soufrées actives).

Les protéines de la fraction F0 sont réduites à l'aide du DTT. Après incubation, l'ensemble est déposé sur une colonne Sephadex<sup>®</sup> G50, élué au tampon 1 afin d'éliminer l'excès de réducteur. Le produit obtenu est déposé sur une nouvelle colonne de Thiopropyl Sepharose B6. L'éluat est effectuée selon le protocole précédent pour séparer les protéines non soufrées, non activables par réduction (F2), des protéines contenant des ponts disulfures activables par réduction (F3).

La fraction F3 est récupérée par élution avec du tampon 2 et la cystéine est éliminée sur SEPHADEX<sup>®</sup> G50.

Les protéines issues de ces différentes fractions (F0 à F3) sont dosées par la méthode de Bradford comme décrit au paragraphe précédent. Une dilution au 10<sup>ème</sup> a été réalisée pour la fraction F0.

## 2. Résultats

### 2.1. Morphologie et structure de la branchie

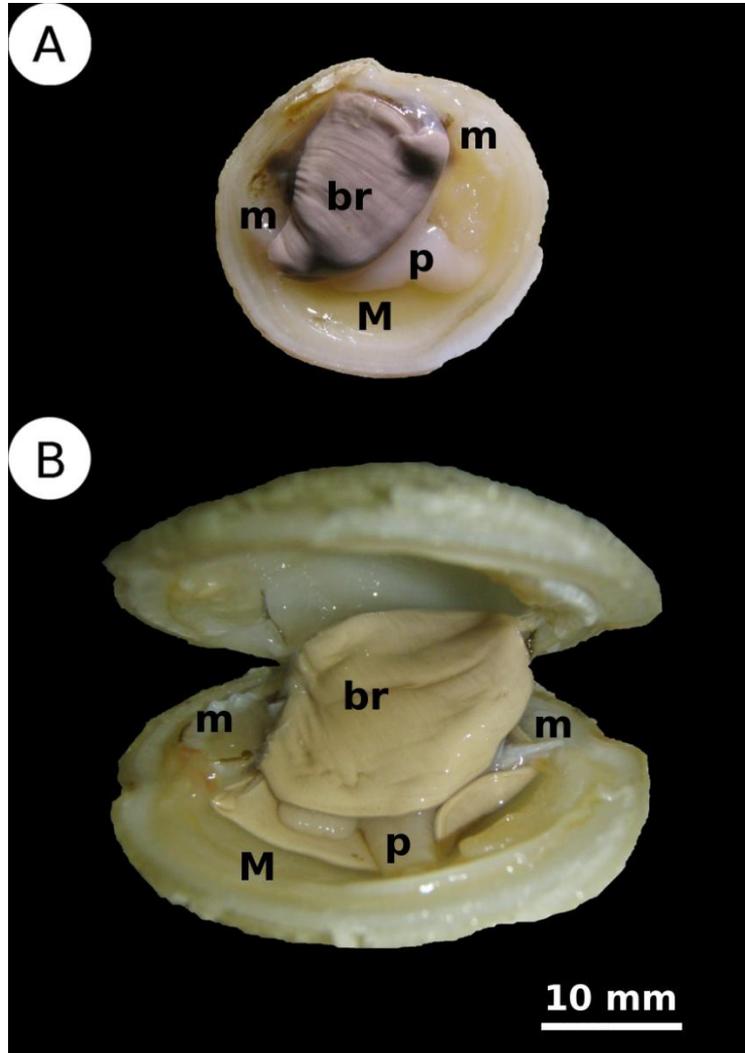
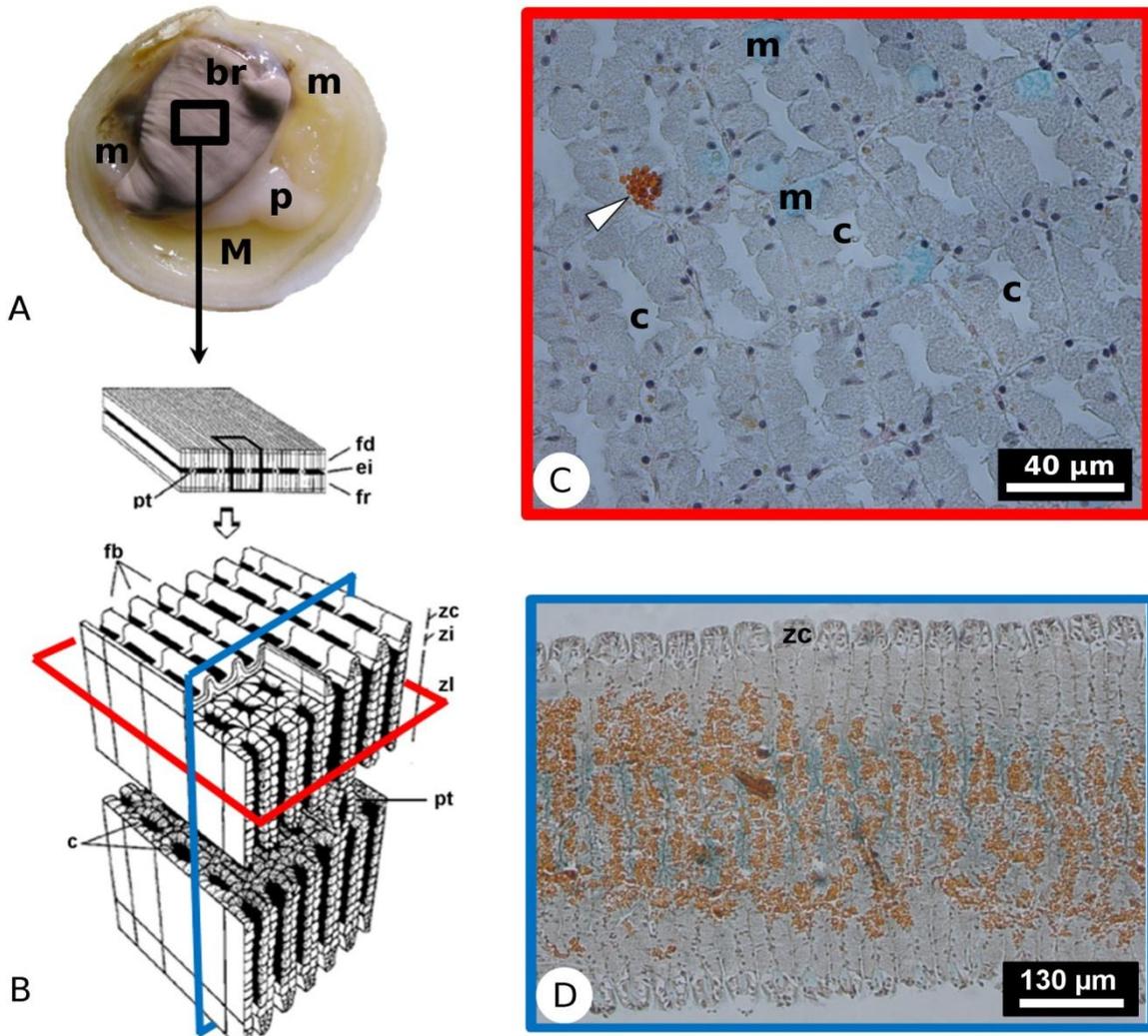


Figure 15 : Photographies des coquilles ouvertes des 2 espèces étudiées.

A : Coquille ouverte de *Codakia orbiculata*. B : Coquille ouverte *Lucina pensylvanica*. br : branchie ; m : muscle ; M : manteau ; p : pied.

Les branchies sont de couleur beige chez *C. orbiculata* (Fig.15A) et brun clair chez *L. pensylvanica* (Fig.15B). Épaisses, homorhabdiques, et non plissées, elles recouvrent la quasi-totalité de la masse viscérale. Chaque branchie est constituée d'une unique lame interne comprenant un feuillet direct ou descendant, et un feuillet réfléchi ou ascendant. Chacun des

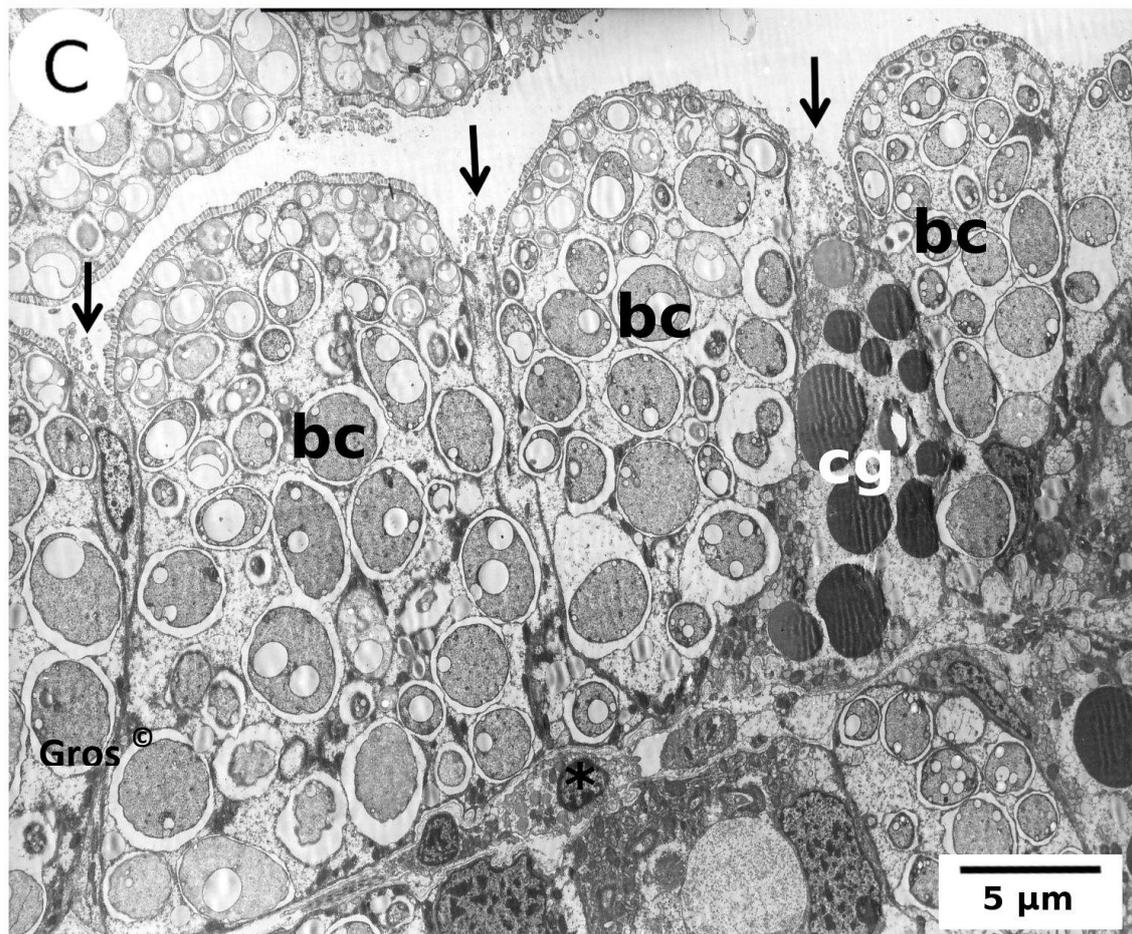
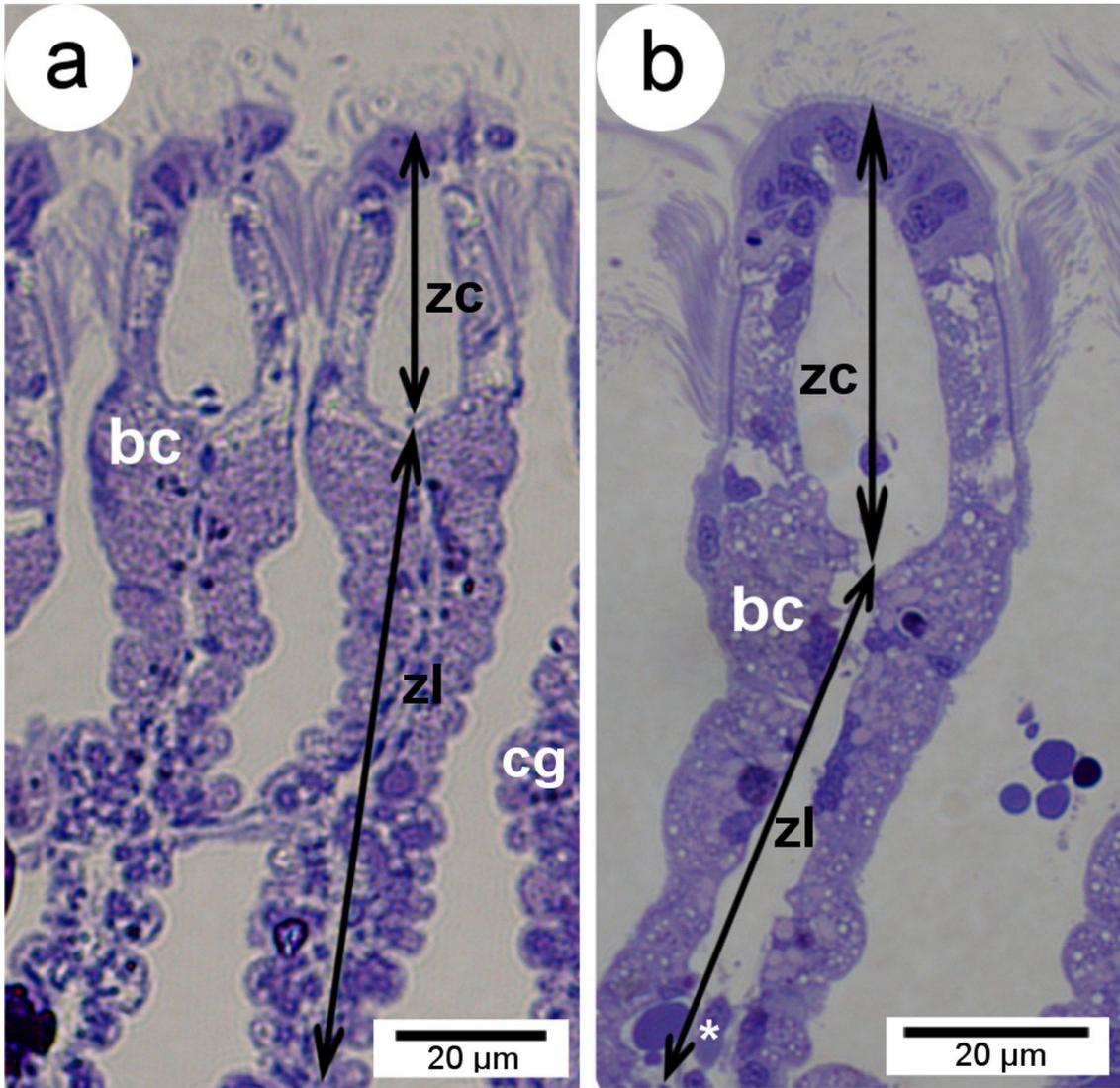
deux feuillets est constitué de filaments branchiaux ciliés et parallèles, reliés entre eux au niveau de la zone abfrontale par des ponts tissulaires (Fig. 16).



**Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation de la branchie des Lucinidae.**

(A) Photographie montrant la branchie (br) en place dans la coquille de *Codakia orbiculata* m : muscle ; M : manteau ; p : pied. (B) Représentations schématiques de l'agrandissement du tissu branchial prélevé, représenté par un rectangle en A (modifié d'après Distel & Felbeck, 1987). c : canal interfilamentaire ; ei : espace interfoliaire ; fb : filament branchial ; fd : feuillet direct ; fr : feuillet réfléchi ; pt : pont tissulaire ; zc : zone ciliée ; zi : zone intermédiaire ; zl : zone latérale. (C) Micrographie montrant les canaux interfilamentaires (c) ou « bactériocytes channels ». Les parois de ces canaux sont formées par les bactériocytes. m : mucocyte ; tête de flèche : cellule à grains. (D) Micrographie d'une coupe transversale de la branchie montrant la juxtaposition des filaments branchiaux constitutifs de la branchie chez *C. orbiculata* après coloration trichrome. zc : zone ciliée.

Le filament branchial de *C. orbiculata* (Fig.17) et *L. pensylvanica* (Fig.18) est un épithélium simple pseudo-stratifié. Chaque filament se compose de trois zones : une zone ciliée, une zone intermédiaire et une zone latérale.



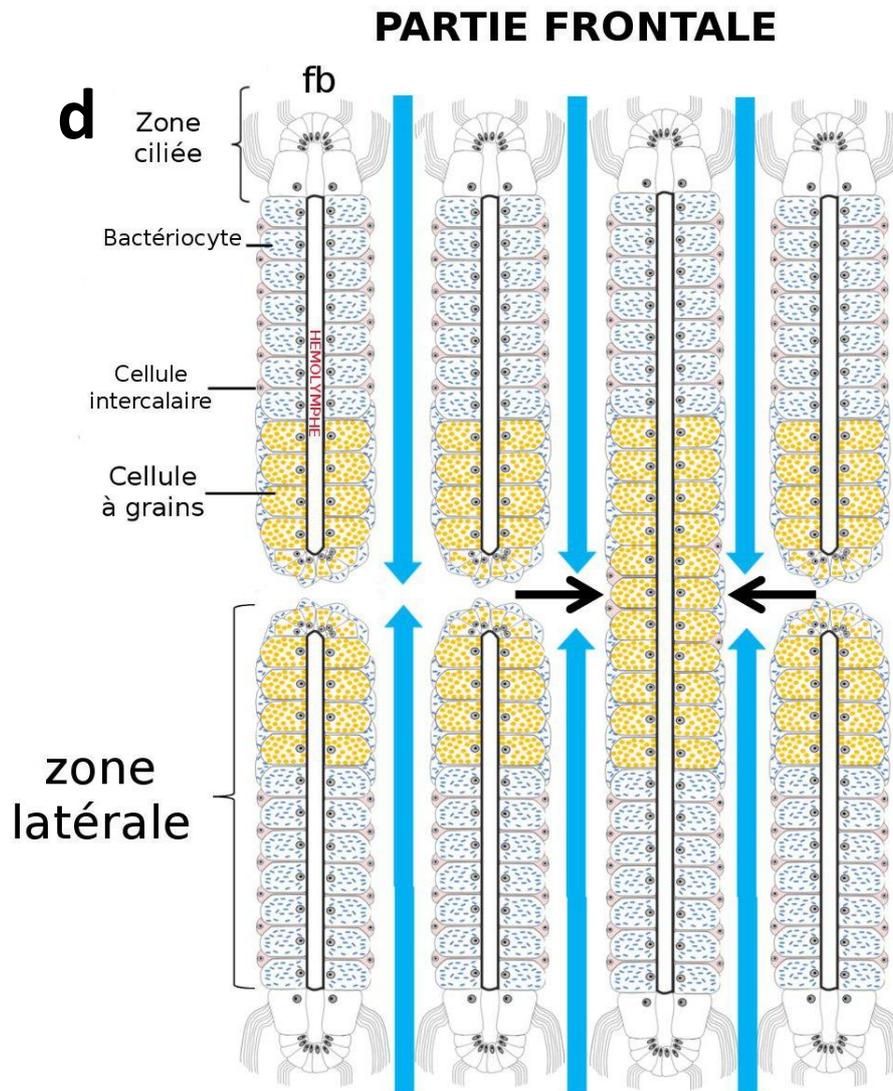


Figure 17 : Structure du filament branchial de *Codakia orbiculata*.

(a) Coupe semi-fine d'un individu  $T_0$  de *Codakia orbiculata*, colorée au bleu de toluidine, montrant l'organisation du filament branchial. La zone ciliée (zc) s'organise autour d'un axe de collagène. La zone latérale (zl) est composée de quatre types cellulaires dont deux sont visibles ici : les bactériocytes (bc) qui hébergent les bactéries symbiotiques et les cellules à grains (cg). Les bactériocytes sont localisés dans la partie frontale de la zone latérale, alors que les cellules à grains sont surtout présentes dans la zone abfrontale. (b) A plus fort grossissement, on peut voir que la zone ciliée (zc) se caractérise par l'absence de bactéries symbiotiques et la présence de nombreux cils aux pôles apicaux des cellules qui la composent. Dans les bactériocytes (bc) de la zone latérale, on peut voir les bactéries symbiotiques chimio-autotrophes caractérisées par la présence de granules de soufre qui apparaissent ici comme des vésicules vides du fait des différents traitements à l'alcool réalisés pour l'inclusion. La zone latérale est parcourue par une lacune sanguine dans laquelle circulent des hémocytes (\*). (c) Ultrastructure de la zone latérale permettant de distinguer les bactériocytes (bc), les cellules à grains (cg), les cellules intercalaires (flèches) et les cellules de l'hémolymphe (\*). Photo O. Gros (d) Représentation schématique de l'organisation des filaments branchiaux en coupe transversale. Le plan de coupe passe par trois canaux interfilamentaires traversés par l'eau de mer, dont le trajet est représenté par les flèches bleues. Chaque filament est constitué de deux zones principales : la zone ciliée, dépourvue de symbiotes et la zone latérale. La zone latérale se compose de quatre types cellulaires : les bactériocytes qui hébergent les symbiotes ; les cellules intercalaires reconnaissables par leur forme allongée, leur pôle apical élargi et leur noyau apical ; les cellules à grains principalement cantonnées à la partie abfrontale du filament ; les mucocytes épars (non représentés ici). Cet épithélium pseudostratifié s'organise autour de la lacune sanguine au travers de laquelle circule l'hémolymphe qui contient les hémocytes. Certains filaments branchiaux ininterrompus relient les deux feuillets de la branchie par des ponts tissulaires (flèches noires). fb : filament branchial.

La **zone ciliée**, qui constitue la partie frontale du filament, est une zone courte d'environ 45  $\mu\text{m}$ , dépourvue de bactéries endosymbiotiques. Elle est constituée de plusieurs types cellulaires dont la majorité possède des cils ou des cirri. Ces cellules sont organisées autour d'un axe de collagène.

La **zone intermédiaire** (non représentée sur les schémas) se limite à une unique couche de cellules. Elle est située entre la zone ciliée et la zone latérale. Elle est également dépourvue de bactéries symbiotiques. Difficilement repérable au microscope photonique chez *C. orbiculata*, (Fig. 17a, b), elle est relativement longue chez *L. pensylvanica* (Fig. 18) où elle mesure environ 30  $\mu\text{m}$ .

La **zone latérale** est la zone la plus abfrontale du filament. C'est également la plus longue des trois zones (environ 300  $\mu\text{m}$  chez *C. orbiculata*). Elle est traversée par une lacune sanguine dans laquelle circulent des hémocytes. Chez *C. orbiculata*, elle est constituée de quatre types cellulaires différents : les bactériocytes, les cellules à grains, les cellules intercalaires et les mucocytes, d'après la dénomination utilisée par Frenkiel & Mouëza (1995) (Fig. 17c).

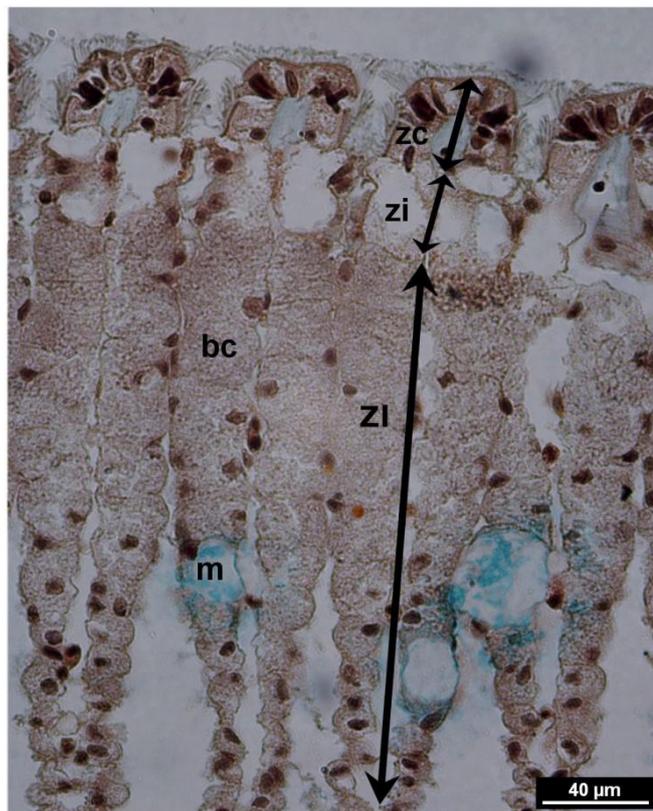
-Les bactériocytes sont les cellules majoritaires du filament branchial. Ils occupent principalement le tiers supérieur de la zone latérale qu'ils partagent essentiellement avec les cellules intercalaires. Ils sont moins nombreux dans la partie abfrontale du filament qu'ils partagent principalement avec les cellules à grains. Les bactériocytes sont de grandes cellules arrondies (environ 20  $\mu\text{m}$  de hauteur chez *C. orbiculata* et 30  $\mu\text{m}$  chez *L. pensylvanica*), qui possèdent un noyau basal. Comme le montre les observations réalisées après hybridation moléculaire par CARD FISH, ce sont les seules cellules du filament branchial à héberger des bactéries symbiotiques. Celles-ci occupent la quasi-totalité du cytoplasme de la cellule. Elles sont légèrement allongées et mesurent jusqu'à 5  $\mu\text{m}$ . Elles ont toutes une double membrane caractéristique des bactéries de type gram-négatif.

-Les cellules à grains (environ 30  $\mu\text{m}$  de hauteur) sont principalement présentes dans les deux tiers inférieurs du filament branchial. Elles sont composées de nombreux grains dont le contenu n'a pas été clairement défini, bien qu'il soit coloré en orange par l'Orange G. Ils sont répartis de façon homogène dans la cellule. Ce type cellulaire, dont le rôle reste inconnu, se retrouve également chez d'autres espèces comme *Codakia orbicularis* (Frenkiel & Mouëza, 1995), *Divaricella quadrisculpta* (Gros *et al.*, 2000) et *Myrtea tanimbarensis* (Brissac *et al.*, 2011) mais n'est pas présent chez tous les Lucinidae. On le trouve aussi chez d'autres bivalves symbiotiques appartenant aux Thyasiridae (Passos *et al.*, 2007).

-Les cellules intercalaires s'intercalent entre les bactériocytes. Elles sont reconnaissables à leur noyau apical et à leur forme triangulaire avec un pôle apical évasé et un pôle basal étroit. Leur fonction demeure incertaine.

-Les mucocytes (non représentés sur les schémas) sont de grandes cellules arrondies (environ 30  $\mu\text{m}$  de hauteur), réparties de manière aléatoire le long de la zone latérale. Sur coupes histologiques, ces cellules sont colorées en bleu par le bleu alcian (pH 2,5) (Fig. 18). Sur coupes semi-fines, elles sont colorées en rouge-rose par le bleu de toluidine.

L'ensemble des filaments branchiaux chez *C. orbiculata* est représenté par la figure 17d.



**Figure 18 : Histologie du filament branchial de *Lucina pensylvanica*.**

Micrographie d'une coupe transversale de la branchie *Lucina pensylvanica* après coloration trichrome. bc : bactériocyte ; m : mucocyte ; zc : zone ciliée ; zi : zone intermédiaire ; zl : zone latérale.

La description de la structure du filament branchial de *L. pensylvanica* a fait l'objet d'une publication de Gros *et al.* (1996). Chez cette espèce, à la différence de *C. orbiculata*, il n'y a pas de cellules à grains et la zone latérale se compose essentiellement de bactériocytes (Fig.18). On y retrouve également quelques cellules intercalaires et mucocytes. La zone intermédiaire est également plus longue que chez *C. orbiculata*. Elle se compose de deux à quatre cellules.

## 2.2. Organisation tissulaire du filament branchial de l'hôte en fonction de la présence ou de l'absence des symbiotes

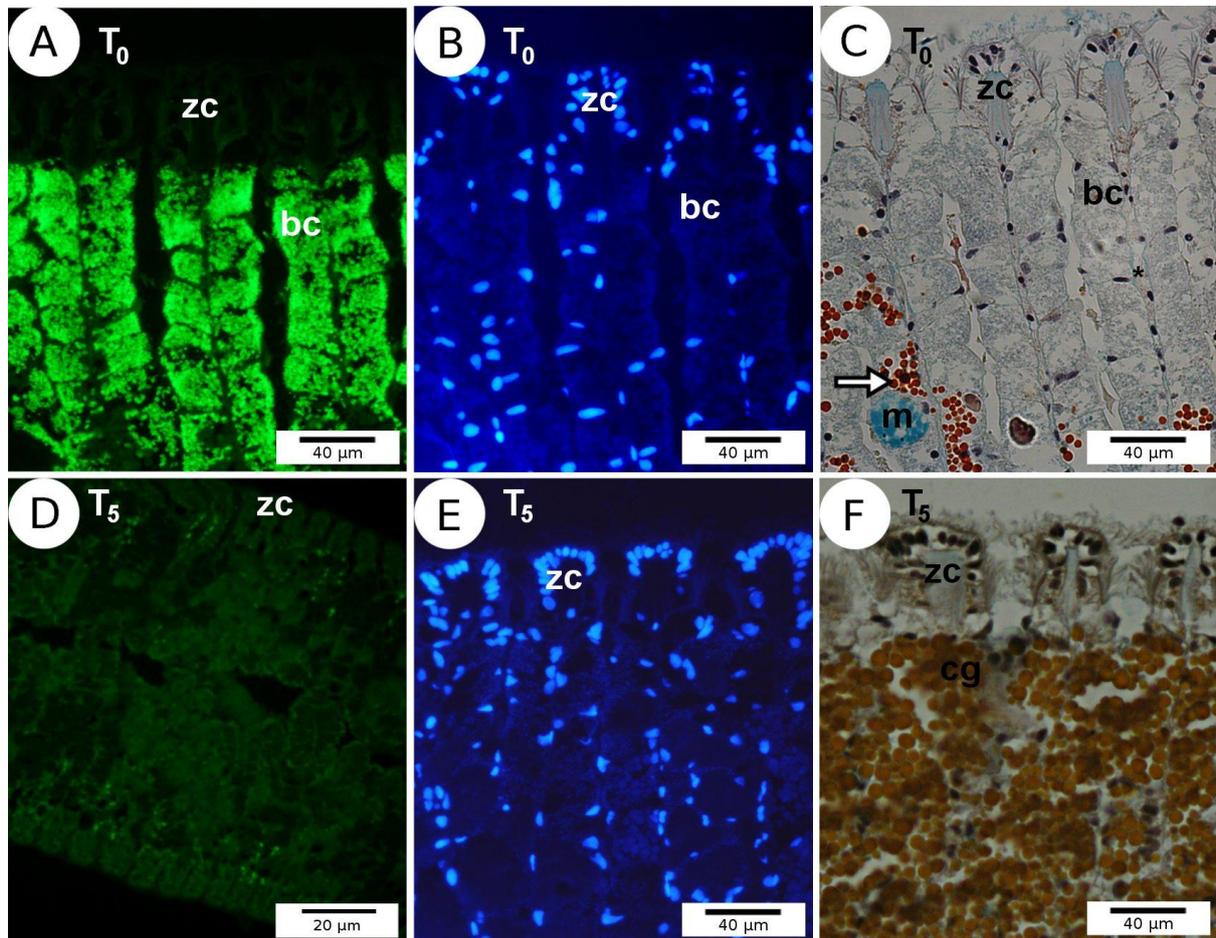
### 2.2.1. *Codakia orbiculata*

La combinaison des résultats obtenus à l'aide du CARD-FISH, des colorations histologiques et du DAPI, a permis de mettre en évidence une organisation différente du filament branchial, en fonction de la présence ou de l'absence des symbiotes sulfo-oxydants chez *C. orbiculata* (Figs. 19 ; 20).

En effet, l'équilibre initial observé entre bactériocytes et cellules à grains chez un individu fraîchement collecté ( $T_0$ ) (Figs. 19A-C) est inversé après un jeûne de cinq mois ( $T_5$ ) (Figs. 19D-F).

A  $T_5$ , la majeure partie du filament branchial est maintenant occupée par les cellules à grains (Fig. 19F). L'espace dévolu aux bactériocytes se situe toujours dans la partie frontale de la zone latérale, mais sa superficie est nettement réduite. Alors qu'à  $T_0$ , les bactériocytes étaient visibles sur toute la longueur du filament branchial et qu'ils en occupaient les 4/5, à  $T_5$ , ils sont restreints au cinquième supérieur de la zone latérale. Cette diminution du « territoire » des cellules hôtes est progressive. Visible dès le premier mois de jeûne, elle s'accroît au fil du temps. Après 3 mois ( $T_3$ ), la diminution des bactériocytes est nette puisque ces derniers n'occupent plus qu'environ 2/5 du filament branchial. A  $T_5$ , il devient très difficile de les observer sur une coloration histologique (Fig. 19F).

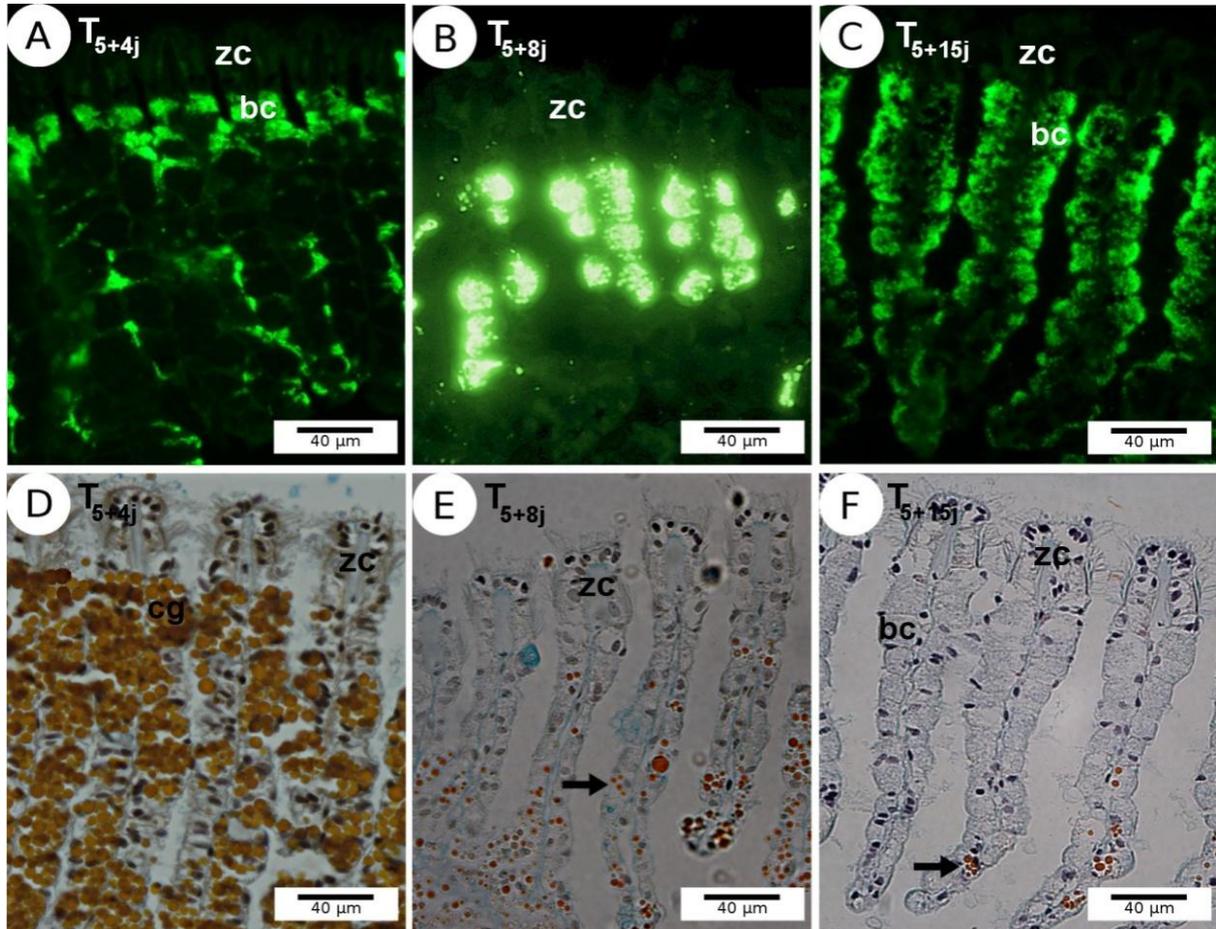
La diminution de l'espace occupé par les bactériocytes s'accompagne également d'une diminution de leur contenu en symbiotes. En effet, le nombre de bactéries détectables au CARD-FISH à l'intérieur de chaque cellule hôte, diminue progressivement durant le jeûne. Ceci confirme nos observations histologiques. Au bout de cinq mois de jeûne, le filament branchial des *C. orbiculata* ne présente plus que très peu de bactéries symbiotiques détectables par CARD-FISH ou par DAPI.



**Figure 19 : Comparaison de l'organisation cellulaire et tissulaire du filament branchial de *Codakia orbiculata* observé au CARD-FISH (A, D), au DAPI (B, E) et en histologie (C, F).**

(A) Chez un individu  $T_0$ , la sonde spécifique des eubactéries (EUBIII) permet l'hybridation des endosymbiotes qui apparaissent colorés en vert grâce au FITC. Les bactéries symbiotiques occupent la totalité du volume cytoplasmique des bactériocytes (bc). Ceux-ci sont situés dans la zone latérale. La zone ciliée (zc), exempte de bactéries, n'est pas hybridée. (B) Les noyaux des cellules eucaryotes à  $T_0$ , sont marqués en bleu par le DAPI. (C) La coloration histologique trichrome des filaments branchiaux d'un individu  $T_0$  montre que les cellules de la zone ciliée possèdent de nombreux cils. La zone latérale est parcourue par une lacune sanguine contenant des hémocytes (étoile) caractérisés par un noyau allongé. Les bactériocytes occupent les 4/5 de la zone latérale. Le cinquième restant est principalement occupé par les cellules à grains (flèche) colorées en orange. m: mucocyte. (D) Chez un individu  $T_5$  l'hybridation de la EUBIII est faible et les bactériocytes sont quasiment dépourvus de symbiotes. (E) Les noyaux des cellules eucaryotes à  $T_5$ , sont marqués en bleu par le DAPI. (F) La coloration histologique (coupe non sériée) montre qu'à ce stade, les cellules à grains (cg) occupent la majeure partie de la zone latérale.

Afin de savoir si un retour des *C. orbiculata* dans leur milieu naturel provoquerait la réapparition des bactéries, certains individus ont été remis dans l'herbier à *Thalassia testudinum* après cinq mois de jeûne. Chez ces individus, les résultats obtenus montrent une augmentation progressive des bactéries symbiotiques et de l'espace occupé par les cellules hôtes à l'intérieur du filament branchial (Fig. 20).



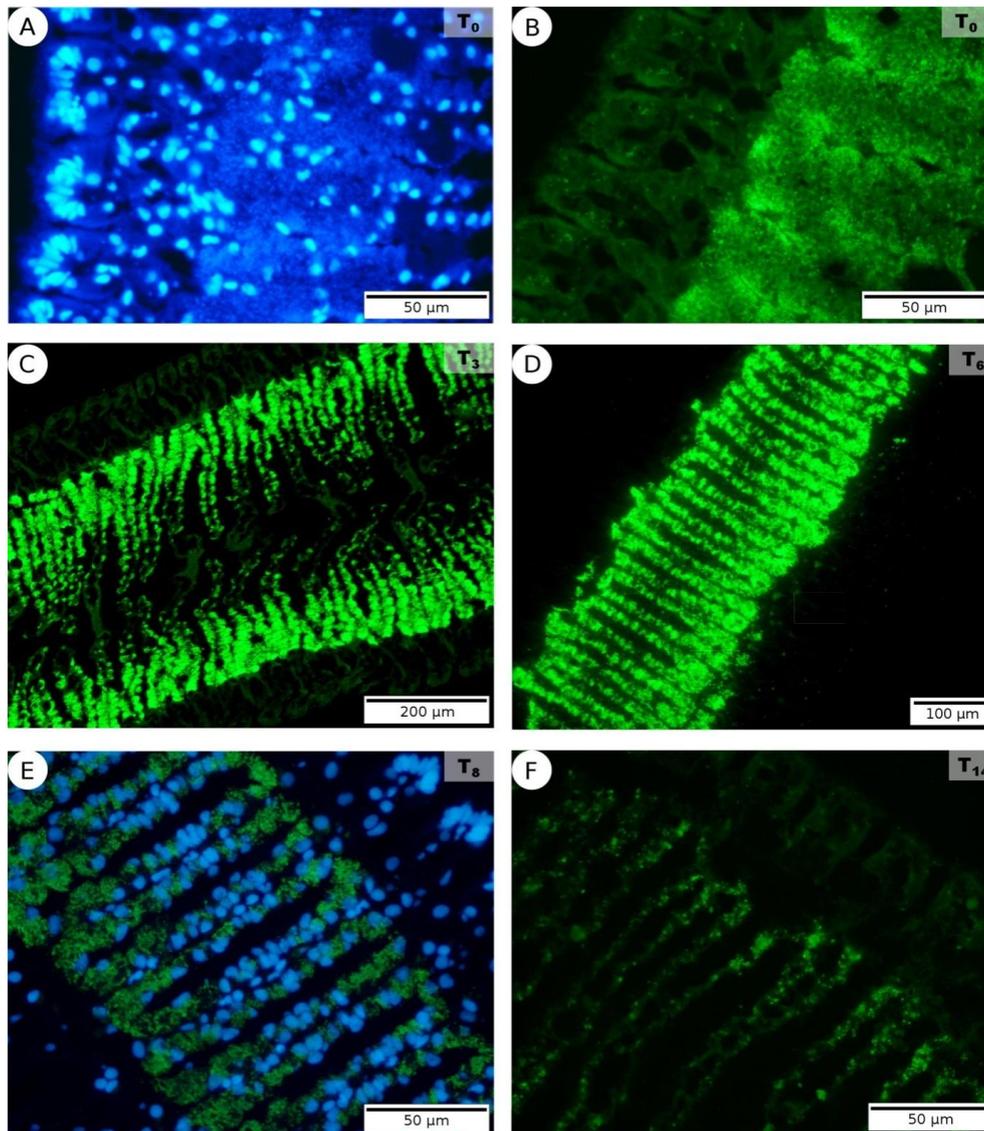
**Figure 20 : Réorganisations cellulaires et tissulaires du filament branchial observées au CARD-FISH (A, B, C) et en histologie (D, E, F) chez *Codakia orbiculata* en recolonisation.**

(A) Chez un individu  $T_{5+4j}$ , les expériences d'hybridation *in situ* montrent que les symbiotes sont de nouveau présents dans les bactériocytes (bc), situés dans la partie frontale de la zone latérale. (D) Les cellules à grains (cg) occupent encore la majeure partie du filament branchial (coupe non sériée). (B) A  $T_{5+8j}$ , le signal dû aux bactéries symbiotiques est plus important. (E) L'espace occupé par les cellules à grains (flèche) a nettement diminué. (C) A  $T_{5+15j}$ , les symbiotes occupent la majeure partie du filament branchial. (F) Les cellules à grains (flèche) sont cantonnées à la zone abfrontale du filament. zc : zone ciliée.

Chez les individus remis moins de 4 jours ( $T_{5+1j}$  et  $T_{5+2j}$ ) dans le sédiment, la réinfection n'est pas évidente. Les tissus semblent désorganisés et fragilisés, et il est difficile d'obtenir un plan de coupe convenable. Il est donc impossible de distinguer clairement les bactériocytes sur une coloration histologique. A ces délais, les hybridations CARD-FISH et le DAPI n'ont pas permis la détection des symbiotes. A  $T_{5+4j}$  (Figs. 20A, D) quelques bactéries sont détectables dans le filament. Le nombre de bactéries à l'intérieur de chaque cellule hôte augmente progressivement. Ainsi, à  $T_{5+8j}$  (Figs. 20B, E) le remplissage des bactériocytes par les symbiotes se poursuit. Les bactériocytes sont, dès lors, clairement identifiables après coloration histologique, et sont situés dans la partie frontale de la zone latérale, à proximité de la zone ciliée. Le reste du filament est majoritairement occupé par les cellules à grains. A  $T_{5+15j}$ , (Figs. 20C, F) l'espace occupé par les bactériocytes s'étend jusqu'à la zone abfrontale

du filament branchial qu'ils partagent avec les cellules à grains. Etonnamment, à ce délai, les intensités de fluorescence du CARD-FISH et du DAPI sont telles qu'elles surpassent celles du  $T_0$  suggérant une augmentation excessive des bactéries et peut-être indirectement des bactériocytes. Cette situation ne dure pas puisqu'à  $T_{5+30j}$  l'organisation du filament ressemble en tout point à ce qui est observé à  $T_0$  suggérant la disparition des cellules en excès.

### 2.2.2. *Lucina pensylvanica*



**Figure 21 : Evolution de la population symbiotique analysée au CARD-FISH et au DAPI chez *Lucina pensylvanica* en décolonisation.**

(A) L'observation d'un  $T_0$  marqué au DAPI, montre l'emplacement des noyaux eucaryotes ainsi que la présence de très nombreux symbiotes tout le long de la zone latérale des filaments branchiaux. (B) Ceci est confirmé par l'hybridation *in situ* (CARD-FISH). (C) A  $T_3$ , et (D) à  $T_6$ , les bactéries symbiotiques semblent toujours aussi nombreuses qu'à  $T_0$ . (E-F) le nombre de bactéries semble diminuer progressivement entre (E)  $T_8$ , et (F)  $T_{14}$  sans toutefois être suffisamment faible pour considérer les individus comme étant aposymbiotiques.

Contrairement à ce qui est observé chez *C. orbiculata*, chez *L. pensylvanica* le jeûne prolongé ne s'accompagne pas d'une réorganisation intense du filament branchial (Fig. 21). Chez *Lucina pensylvanica*, après six mois de jeûne ( $T_6$ ), le filament présente toujours la même structure (Fig. 21D). Après huit mois ( $T_8$ ) (Fig. 21E), les hybridations CARD-FISH montrent que le nombre de bactéries détectées par bactériocyte diminue. A  $T_{14}$  (Fig. 21F), qui correspond au temps d'observation maximal que nous ayons effectué, les bactéries symbiotiques sont toujours présentes dans le filament, même si leur nombre a nettement diminué. Après 6 mois de jeûne, comparativement à ce qui a été montré chez *C. orbiculata* à un délai proche (Fig. 19D), le nombre de symbiotes à l'intérieur du filament branchial de *L. pensylvanica* est resté trop élevé pour nous permettre de réaliser des expériences de recolonisation. Après 14 mois de jeûne, le niveau en symbiote avait suffisamment diminué pour permettre la réalisation des expérimentations de recolonisation mais le faible nombre d'individus (2) n'a permis de réaliser qu'une expérimentation préliminaire d'après laquelle il semble qu'il soit également possible d'amorcer la réinfection chez les individus de *Lucina pensylvanica* au bout de 26 jours dans l'herbier (Fig. 22).

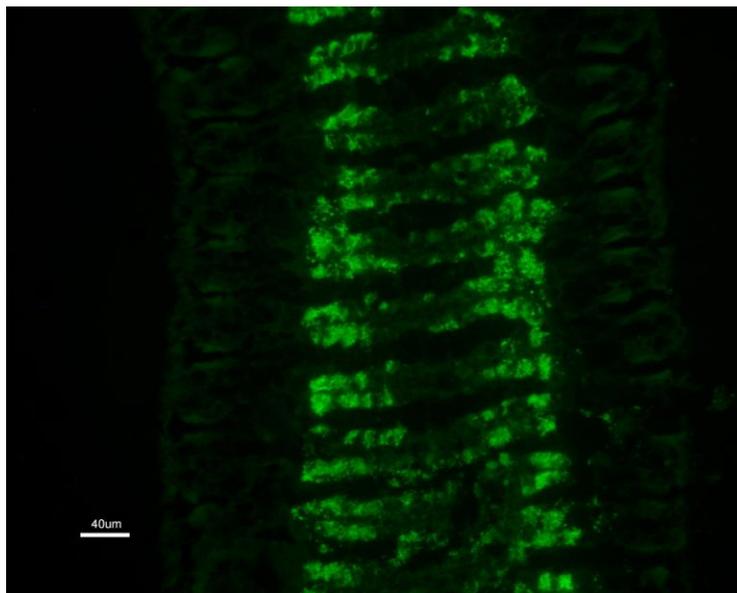


Figure 22 : *Lucina pensylvanica* ayant jeûné 14 mois avant d'être remis 26 jours dans le milieu.

### 2.3. Prolifération cellulaire

La mise en évidence de la prolifération cellulaire résulte du suivi immunohistochimique sur coupe de la phospho-histone 3, ainsi que du BrdU préalablement incorporé *in vivo*. Dans un souci de simplification, les cellules présentant une immunoréactivité au BrdU seront notées « BrdU<sup>+</sup> », et les cellules présentant une immunoréactivité à la phospho-histone 3 seront

notées « PH3<sup>+</sup> ». Comme mentionné dans la partie Matériel et méthodes, ces deux anticorps permettent un marquage nucléaire des cellules en prolifération.

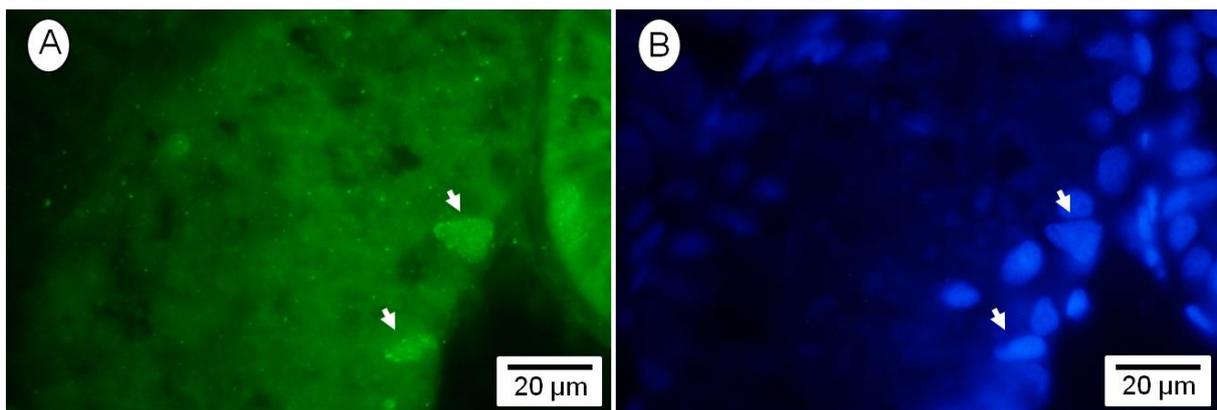
Les expériences préliminaires réalisées pour élaborer le protocole expérimental nous ont montré que :

-L'inclusion en résine de polyester est préférable à l'inclusion en paraffine, pour la détection par immunohistochimie de l'intégration du BrdU. En effet, les analyses effectuées sur les coupes issues d'inclusion en paraffine, n'ont pas donné de résultats. L'utilisation de coupes épaisses, réalisées à froid, a donné des résultats positifs mais elle ne permet pas la distinction des types cellulaires de la zone latérale, contrairement à la résine de polyester.

-La concentration choisie pour la solution de BrdU (200 µg/ml) est suffisante pour permettre son intégration et sa détection dans les tissus de la moule *Brachidontes exustus* (Fig. 23), et de *Codakia orbiculata*.

-Une incubation de 2 heures dans cette solution est également suffisante pour permettre l'incorporation et la détection du BrdU dans les tissus. En effet, nous n'avons pas observé de différence de marquage entre les individus incubés 2 heures et les individus incubés 5 heures.

La mise en évidence de la prolifération cellulaire a ensuite été réalisée chez des individus de l'espèce *Codakia orbiculata* fraîchement collectés de l'herbier (T<sub>0</sub>), ayant subi un jeûne de cinq mois (T<sub>5</sub>) et réintroduits dans l'herbier pour des durées variables (T<sub>5+1j</sub> à T<sub>5+30j</sub>). Une synthèse des résultats est présentée dans le tableau 6 et une attention particulière est donnée au temps T<sub>5+8j</sub>, (Fig. 25) pour lequel une forte immunoréactivité aux BrdU et à la PH3 a été observée.



**Figure 23 : Micrographies de la masse viscérale de *Brachidontes exustus* obtenues au microscope à fluorescence pour validation du protocole BrdU.**

**A** : Les noyaux positifs au BrdU (flèche) sont révélés en vert (FITC). **B** : L'ensemble des noyaux est révélé en bleu (DAPI).

Rappelons que les expériences d'immunohistochimie (BrdU, PH3), de contre-coloration au DAPI et les expériences de CARD-FISH ont été effectuées sur coupes sériées, afin de pouvoir identifier les types cellulaires grâce à la présence ou à l'absence des bactéries, ainsi qu'à la position des noyaux. Les résultats sont présentés de manière semi-quantitative car, du fait de l'organisation du tissu (épithélium pseudo-stratifié comportant quatre types cellulaires dont trois avec un noyau basal), il ne nous a pas toujours été permis d'attribuer avec précision un type cellulaire à tous les noyaux révélés au DAPI. De ce fait, l'acquisition de données quantitatives était compromise. De plus, les noyaux sont trop nombreux sur une coupe pour pouvoir tous les compter. Les marquages n'étant pas homogènes sur la coupe, il n'était pas non plus possible de choisir aléatoirement des zones de comptage, sans risquer de fausser les résultats.

**Tableau 6 : Synthèse des résultats relatifs à la prolifération cellulaire, obtenus par immunohistochimie sur coupes histologiques chez *Codakia orbiculata*.**

Les résultats sont présentés de manière semi-quantitative : (-) correspond à une absence de marquage. La présence de marquage est notée par le signe (+), elle est croissante de (+) à (+++). Ainsi, (+) correspond à peu de noyaux marqués, (++) correspond à un nombre modéré de noyaux marqués, (+++) correspond à de nombreux noyaux marqués. ∅ correspond à l'absence d'observation d'un type cellulaire.

Type cellulaire \ Délai	T <sub>0</sub>		T <sub>5</sub>		T <sub>5+8j</sub>		T <sub>5+15j</sub>	
	BrdU	PH3	BrdU	PH3	BrdU	PH3	BrdU	PH3
<b>Cellules de la zone ciliée</b>	++	-	+	-	++	+	++	-
<b>Bactériocytes</b>	+	-	-	-	+	-	-	-
<b>Cellules indifférenciées</b>	∅	∅	∅	∅	+++	++	∅	∅
<b>Cellules à grains</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cellules intercalaires</b>	+	-	-	-	+++	++	+	-
<b>Hémocytes</b>	+	-	++	-	+	+	+	+

D'une manière générale, les types cellulaires concernés par l'immunoréactivité au BrdU étaient les mêmes que ceux concernés par l'immunoréactivité à la PH3. Les cellules BrdU<sup>+</sup> étaient toutefois beaucoup plus nombreuses que les cellules PH3<sup>+</sup> (Fig. 25C, E). Des cellules BrdU<sup>+</sup> ont été observées dans tous les échantillons analysés, et ce, dans des proportions variables. Cette variabilité était surtout fonction du marquage des cellules de la zone latérale,

car la zone ciliée et la lacune sanguine présentaient de manière systématique une immunoréactivité positive au BrdU (Fig. 25A). Partant de ce constat, ces zones ont été choisies comme témoins positifs internes à nos expérimentations.

L'immunoréactivité de la zone ciliée ne semblant pas concerner un type cellulaire particulier et n'étant pas directement liée à la plasticité tissulaire et cellulaire observée au niveau de la zone latérale, nous n'en ferons qu'une brève description.

Chez les individus témoins, fraîchement collectés de l'herbier ( $T_0$ ), une faible immunoréactivité au BrdU est détectée dans l'ensemble des zones du filament branchial (Fig. 24). Seules quelques cellules de la zone ciliée sont positives au BrdU, et la majorité des cellules BrdU<sup>+</sup> de la zone latérale sont des cellules intercalaires. Aucune immunoréactivité au BrdU n'a été détectée dans les ponts tissulaires.

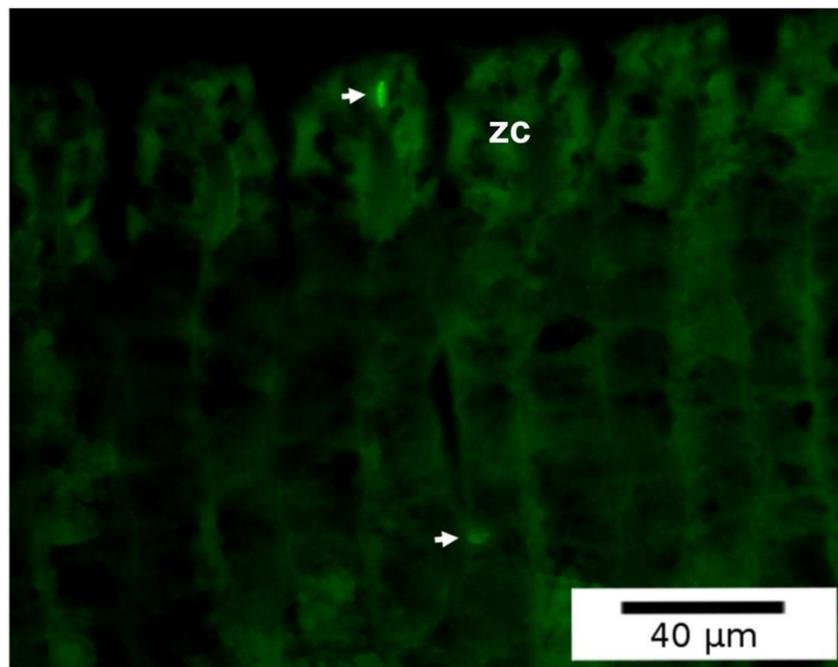


Figure 24 : Prolifération cellulaire chez *Codakia orbiculata* à  $T_0$ .

Illustration de la faible immunoréactivité au BrdU du filament branchial à  $T_0$ . Sur cette micrographie, on distingue une cellule de la zone ciliée et une cellule intercalaire, positives au BrdU. zc : zone ciliée.

Quelques bactériocytes épars sont également marqués ainsi que quelques hémocytes. Aucune immunoréactivité à la PH3 n'a été détectée pour ce délai.

Chez les individus ayant subi cinq mois de jeûne prolongé ( $T_5$ ), la prolifération cellulaire est moins importante que chez les  $T_0$ . Seule une faible immunoréactivité au BrdU des hémocytes et des cellules de la zone ciliée est détectable à ce délai. Par ailleurs, aucune cellule PH3<sup>+</sup> n'est observable.

Chez les individus recolonisés (Fig. 25), de manière surprenante, nous n'avons pas observé de bactériocyte BrdU<sup>+</sup>. Durant les premiers jours de retour dans le sédiment, l'observation des tissus, qui semblent désorganisés, ne révèle qu'un très faible niveau de prolifération cellulaire, essentiellement localisé dans la zone ciliée et les cellules de la lacune sanguine.

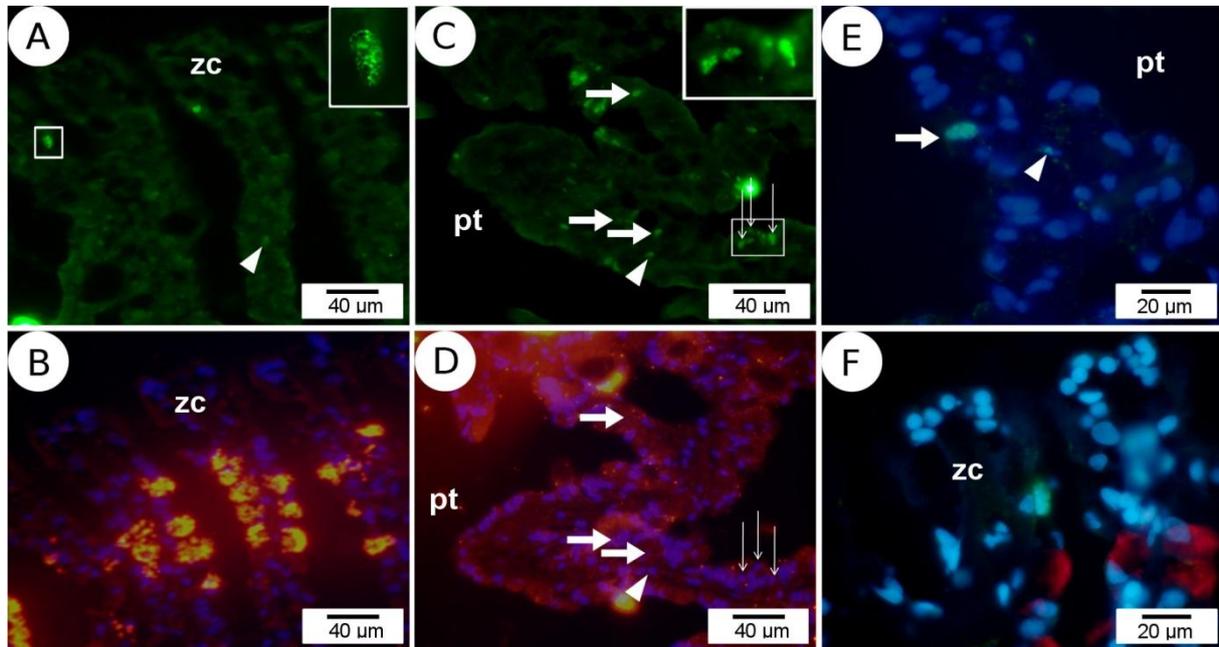
La période comprise entre quatre et huit jours de recolonisation, est celle qui conduit aux observations les plus intéressantes. Elle se caractérise tout d'abord par une augmentation générale de l'immunoréactivité de la zone latérale aux marqueurs de la prolifération cellulaire. La zone ciliée présente classiquement quelques noyaux BrdU<sup>+</sup> (Figs. 25A, B), mais dans la zone latérale, des zones de forte prolifération cellulaire sont détectées au niveau des ponts tissulaires (Figs. 25C-E). Ces zones sont caractérisées par une forte immunoréactivité au BrdU, et dans une moindre mesure, à la PH3. Si l'on observe ces mêmes zones sur une coupe sériée après hybridation *in situ* (CARD-FISH), on constate que les cellules BrdU<sup>+</sup> (Fig. 25C) et PH3<sup>+</sup> (Fig. 25E) sont totalement vides de bactéries (Figs. 25D-E). La majeure partie d'entre elles peuvent être identifiées comme étant des cellules intercalaires, car elles possèdent un noyau en position apicale. En revanche, d'autres cellules BrdU<sup>+</sup> sont aussi détectées. Elles ont la particularité de présenter un noyau en position basale et d'être dépourvues de bactéries, de grains et de mucus (Figs. 25C-D). Ces cellules, que l'on pourrait qualifier de cellules indifférenciées, n'ont été observées qu'à ce délai de recolonisation.

Après quinze jours de recolonisation, la prolifération cellulaire revient à des niveaux relativement faibles dans le filament branchial, et ce, quelle que soit la zone considérée. Seules quelques cellules de la zone ciliée, quelques cellules intercalaires et quelques hémocytes sont encore BrdU<sup>+</sup> et/ou PH3<sup>+</sup>.

## 2.4. Mort cellulaire

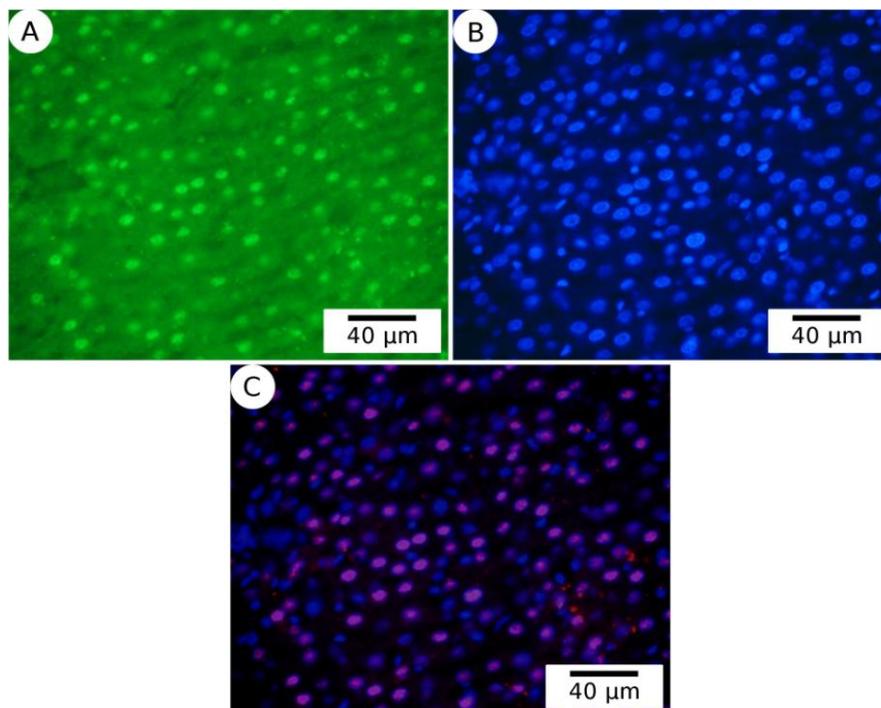
La mise en évidence de la mort cellulaire résulte du marquage sur coupe des cellules par la méthode TUNEL et du suivi par immunohistochimie de la caspase 3. Par souci de simplification, les cellules présentant un marquage de leur noyau seront notées « TUNEL<sup>+</sup> » ou « CASP3<sup>+</sup> ».

Au cours des expériences préliminaires que nous avons menées, l'utilisation de l'anti-caspase 3 a donné des résultats positifs sur le foie de rat (*Rattus norvegicus*) (Fig. 26). Il en va de même pour le marquage par la méthode TUNEL. Toujours d'après nos expériences préliminaires, les inclusions en résine de polyester et en paraffine donnent des résultats équivalents. Nous avons donc opté pour la résine de polyester qui permet de mener les



**Figure 25 : Prolifération cellulaire chez *Codakia orbiculata* après huit jours de ré-infection.**

Chez un individu  $T_{5+8j}$  (A), quelques noyaux  $BrdU^+$  sont visibles dans la zone ciliée. (B) Le double marquage CARD-FISH (rouge) et DAPI (bleu) montre que ces cellules sont dépourvues de symbiotes. (C) Au niveau des ponts tissulaires, de nombreuses cellules intercalaires, caractérisées par un noyau apical (encadré, flèches fines) sont  $BrdU^+$ . Des cellules indifférenciées possédant un noyau basal sont également  $BrdU^+$  (flèches). (D) Notons que le double marquage CARD-FISH (rouge) et DAPI (bleu) montre que ces cellules sont dépourvues de bactéries (flèches). (E) Le double marquage PH3 (noyaux verts) et DAPI (noyaux bleus) permet également de mettre en évidence des cellules intercalaires en prolifération dans les ponts tissulaires. (F) Le triple marquage CARD-FISH (rouge), anti-PH3 (noyau vert) et DAPI (noyaux bleus) montre la prolifération cellulaire au niveau de la zone ciliée. zc : zone ciliée ; pt : pont tissulaire ; tête de flèche: hémocyte marqué.



**Figure 26 : Micrographies du foie de *Rattus norvegicus* obtenues au microscope à fluorescence pour validation du protocole caspase 3.**

**A** : Les noyaux positifs à la caspase 3 sont révélés en vert (FITC). **B** : L'ensemble des noyaux est révélé en bleu (DAPI). **(C)** Superposition des marquages montrant que les structures immunopositives sont bien des noyaux. Les noyaux positifs à l'anti-caspase 3 apparaissent en violet.

expériences sur des coupes adjacentes à celles réalisées pour la détection de la prolifération cellulaire.

Comme pour les expériences de prolifération cellulaire, la mort cellulaire a été étudiée chez des individus *Codakia orbiculata* fraîchement collectés de l'herbier (T<sub>0</sub>), chez des individus ayant subi un jeûne de cinq mois (T<sub>5</sub>) et chez des individus réintroduits dans l'herbier (T<sub>5+1j</sub> à T<sub>5+30j</sub>). Une synthèse des résultats est présentée dans le tableau 7.

Rappelons que les expériences de mise en évidence de la mort cellulaire (TUNEL, caspase 3) contre-colorées au DAPI et les expériences de CARD-FISH ont été effectuées sur coupes sériées afin de pouvoir identifier les types cellulaires, grâce à la présence ou à l'absence des bactéries, ainsi qu'à la position des noyaux.

**Tableau 7 : Synthèse des résultats relatifs à la mort cellulaire, obtenus par immunohistochimie sur coupes histologiques chez *Codakia orbiculata*.**

Les résultats sont présentés de manière semi-quantitative : (-) correspond à une absence de marquage. La présence de marquage est notée par le signe (+), elle est croissante de (+) à (+++). Ainsi, (+) correspond à peu de noyaux marqués, (++) correspond à un nombre modéré de noyaux marqués, (+++) correspond à de nombreux noyaux marqués. Ø correspond à l'absence d'observation d'un type cellulaire.

Type cellulaire \ Délai	T <sub>0</sub>		T <sub>5</sub>		T <sub>5+8j</sub>		T <sub>5+15j</sub>	
	TUNEL	CASP3	TUNEL	CASP3	TUNEL	CASP3	TUNEL	CASP3
<b>Cellules de la zone ciliée</b>	++	+	++	+	++	+	++	+
<b>Bactériocytes</b>	++	+	++	+	+	+	+++	++
<b>Cellules indifférenciées</b>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
<b>Cellules à grains</b>	++	-	+++	++	+++	++	++	-
<b>Cellules intercalaires</b>	++	+	+++	++	++	+	++	+
<b>Hémocytes</b>	++	+	+++	++	++	+	++	+

Pour les mêmes raisons que celles énoncées pour les résultats de la prolifération cellulaire, les résultats relatifs à la mort cellulaire, sont présentés de manière semi-quantitative.

Les résultats, obtenus par la méthode TUNEL et par l'utilisation d'anti-caspase 3, sont convergents. Toutefois, le nombre de cellules TUNEL<sup>+</sup> est toujours beaucoup plus important

que le nombre de cellules CASP3<sup>+</sup>. Quels que soient les délais étudiés, la zone ciliée et la lacune sanguine ont présenté une forte proportion de cellules immunoréactives.

Chez les individus T<sub>0</sub>, nous avons détecté du marquage chez tous les types cellulaires.

Chez les individus T<sub>5</sub> (Fig. 27), exception faite des bactériocytes, pour lesquels le niveau d'immunoréactivité reste relativement constant, la mort cellulaire augmente dans tous les types cellulaires de la zone latérale comparativement aux T<sub>0</sub>. Cette augmentation est particulièrement remarquable pour les cellules à grains.

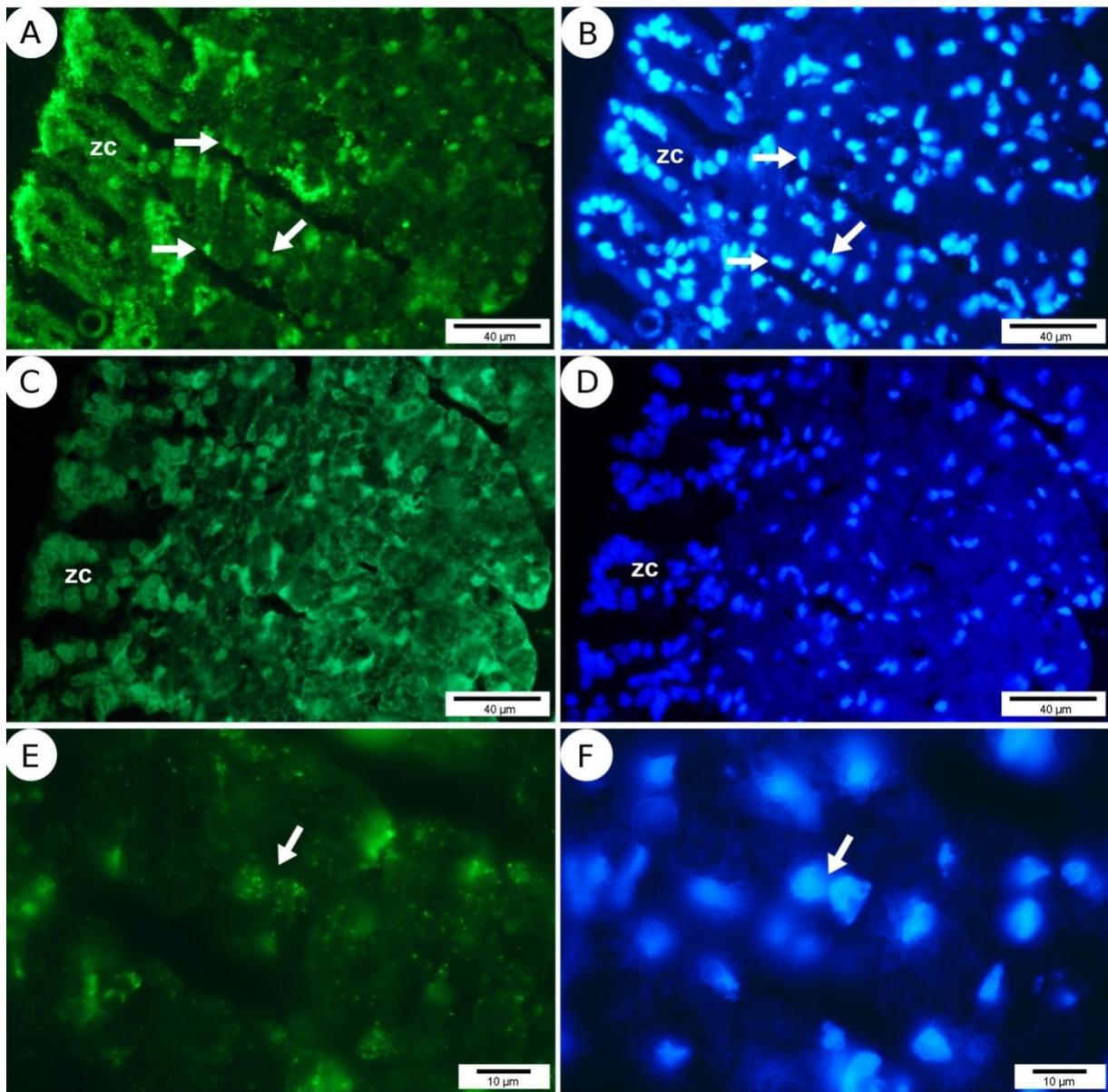


Figure 27 : Mort cellulaire chez *Codakia orbiculata* après cinq mois de jeûne prolongé.

(A) Les noyaux CASP3<sup>+</sup> (noyaux verts, flèches), (B) contre-colorés au DAPI (bleus, flèches) montrent qu'il existe une mort cellulaire importante des cellules à grains et des cellules intercalaires. Le signal obtenu avec l'anti-caspase 3 est plus faible que (C) le signal obtenu à l'issue du TUNEL (noyaux verts) (D) contre-coloré à l'aide du DAPI (noyaux bleus). (E) L'observation à plus fort grossissement de la zone latérale permet de mettre en évidence des noyaux CASP3<sup>+</sup> de cellules à grains (noyaux verts, flèche), dépourvues de bactéries (F) comme cela est confirmé par la contre-coloration au DAPI (noyaux bleus, flèche). zc: zone ciliée.

Chez les individus replacés dans leur habitat naturel, la mort cellulaire au sein de la zone latérale diminue de façon progressive au fil des jours de recolonisation bactérienne, comparativement aux  $T_5$ . Après huit jours consécutifs dans le sédiment, l'apoptose concerne surtout les hémocytes et les cellules à grains. Rares sont les bactériocytes et les cellules intercalaires à présenter des noyaux marqués. Après quinze jours passés dans le sédiment, le niveau d'apoptose diminue un peu plus chez tous les types cellulaires, à l'exception des bactériocytes. En effet, le niveau d'apoptose, qui est resté relativement faible, mais constant dans les bactériocytes, subit une augmentation entre les stades de  $T_{5+15j}$  à  $T_{5+30j}$  suggérant l'élimination des cellules en excès. A  $T_{5+30j}$ , ce niveau revient à des valeurs comparables à celles du  $T_0$ .

## 2.5. Evolution des protéines au cours du jeûne

### 2.5.1. Chez *C. orbiculata*

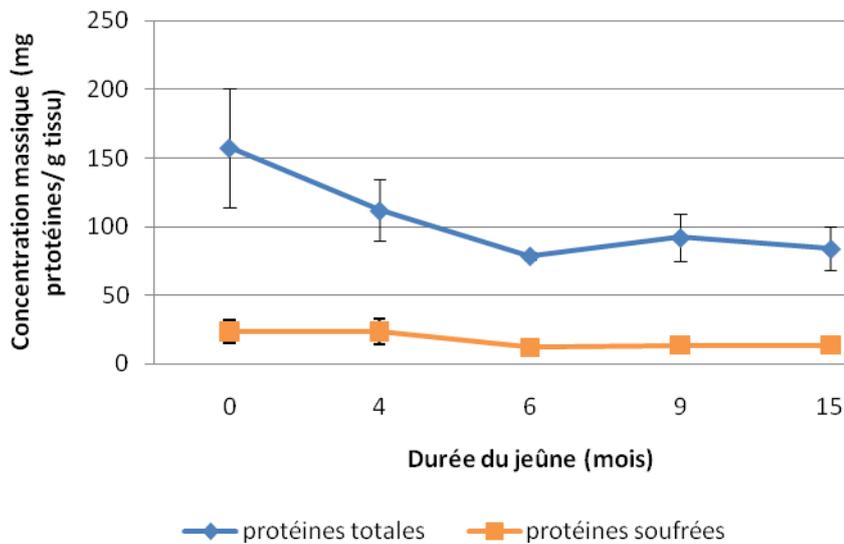


Figure 28 : Evolution de la concentration en protéines chez *Codakia orbiculata* au cours du jeûne.

Pour chaque temps de traitement, les dosages ont été effectués sur trois individus et répétés trois fois par individu. Les protéines sulfurées correspondent à la somme des fractions F1 (les protéines sulfurées actives possédant des thiol libres) et F3 (les protéines contenant des ponts disulfures activables par réduction). Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

L'observation de l'évolution de la concentration en protéines totales en décolonisation (courbe bleue) montre une diminution de la concentration massique en protéines totales

durant le jeûne. Au cours des 4 premiers mois de jeûne, on observe une perte de 29% en protéines totales. Cette valeur atteint 46,7% à la fin de l'expérimentation (T<sub>15</sub>). Les cellules à grains ayant été décrites comme riches en protéines soufrées (Frenkiel & Moueza, 1995) nous avons également suivi l'évolution de ces protéines durant le jeûne. Contrairement aux résultats obtenus en histologie et en CARD-FISH, qui montrent une augmentation de la part occupée par ces cellules dans la zone latérale, les concentrations massiques en protéines soufrées (courbe orange) restent constantes durant les 4 premiers mois de jeûne. Elles diminuent également de près de moitié (42,4%) entre T<sub>4</sub> et T<sub>15</sub> durant le jeûne.

### 2.5.2. Chez *L. pensylvanica* :

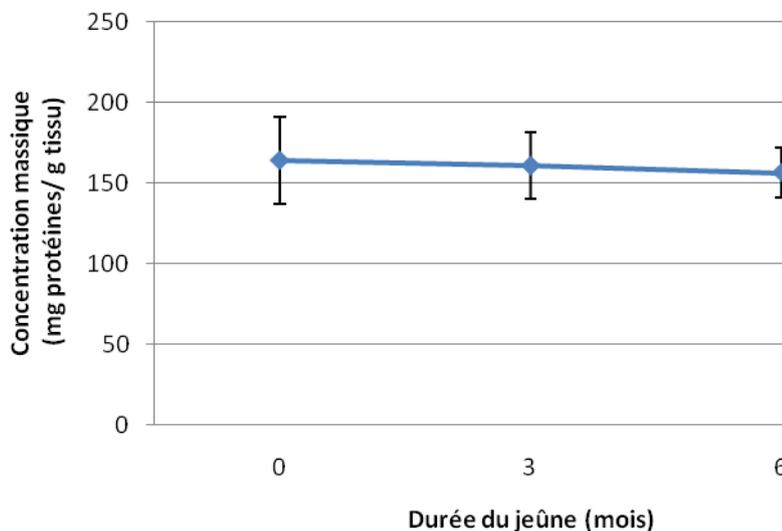


Figure 29 : Evolution de la concentration en protéines totales chez *Lucina pensylvanica* au cours du jeûne.

Pour chaque délai, les dosages ont été effectués sur trois individus et répétés trois fois par individu. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

Contrairement à ce qui est observé chez *C. orbiculata*, chez *L. pensylvanica* les concentrations massiques en protéines totales restent relativement stables au cours du jeûne. Entre T<sub>0</sub> et T<sub>6</sub>, on observe une diminution de 4,6%. Les cellules à grains étant absentes de la zone latérale de cette espèce, nous n'avons pas procédé au suivi de l'évolution des protéines soufrées durant le jeûne.

## 3. Discussion

### 3.1. Organisation du filament branchial

Les résultats de notre étude sur *Codakia orbiculata*, sont en accord avec la description des filaments branchiaux d'un bivalve du même genre, *C. orbicularis*, faite par Frenkiel & Mouëza (1995). Comme chez *C. orbicularis*, le filament branchial de *C. orbiculata* s'organise en trois zones : une zone ciliée, une courte zone intermédiaire et une zone latérale comprenant quatre types cellulaires (bactériocytes, cellules à grains, mucocytes et cellules intercalaires). En plus de ces types cellulaires, nous avons également mis en évidence la présence de cellules que l'on pourrait qualifier d'indifférenciées, situées au niveau des ponts tissulaires de la branchie, chez les individus remis huit jours dans l'herbier. D'après la position basale de leurs noyaux, ces cellules pourraient se différencier en bactériocytes, en cellules à grains ou en mucocytes. Dans une étude portant sur les juvéniles de *C. orbicularis*, Gros *et al.* (1997) ont décrit l'existence de cellules indifférenciées, situées dans la zone latérale, au contact direct de l'eau de mer, car non recouvert par le pôle apical des cellules intercalaires. Ces cellules possèdent un noyau basal et contiennent quelques rares organites. Les branchies des juvéniles, observées dans cette étude ne présentaient qu'un feuillet et donc pas de ponts tissulaires, puisque ceux-ci apparaissent avec la mise en place du second feuillet (Olivier Gros, communication personnelle). Notre étude montre l'existence d'autres cellules non différenciées situées, cette fois dans les ponts tissulaires, chez les *Codakia orbiculata* adultes. Dans une étude récente, Pflugfelder *et al.* (2009) ont également montré l'existence de cellules souches unipotentes de type bactériocyte dans le trophosome de Siboglinidae adultes.

Chez le soudon, *Lucina pensylvanica*, l'observation que nous avons faite de l'organisation du filament branchial est également en accord avec la description antérieure de Gros *et al.* (1996). Le filament branchial présente lui aussi trois zones : la zone ciliée plus courte que chez *C. orbiculata* ; la zone intermédiaire plus longue et composée d'une ou deux couches de cellules ; la zone latérale, dépourvue de cellules à grains.

## 3.2. Les mécanismes de la plasticité tissulaire et cellulaire

### 3.2.1. Plasticité des filaments branchiaux

L'étude de la plasticité tissulaire au cours d'un jeûne prolongé, menée durant ce travail de thèse, est la première à rapporter des résultats réalisés sur une période aussi longue, chez les Lucinidae. En effet, pour ce travail, certains individus ont été maintenus au laboratoire sans apport direct de nourriture, ni de soufre dissous, pendant quinze mois. La filtration de l'eau de mer à 0,22 µm ne permettant pas d'éliminer la matière organique dissoute et les sulfates, il se pourrait que ces éléments constituent une source d'énergie pour le couple symbiotique.

Les résultats de cette étude montrent que durant le jeûne, l'espace occupé par les bactériocytes au sein de la zone latérale diminue progressivement. Ceci s'accompagne d'une diminution progressive du nombre de bactéries intracellulaires détectables par hybridation *in situ*.

Des études portant sur d'autres bivalves ont également montré une diminution des symbiotes chez les animaux privés de soufre. C'est le cas des Vésicomidae *Calyptogena kilmeri* et *C. pacifica*, gardés en captivité deux et neuf jours (Goffredi *et al.*, 2004). C'est le cas de Thyasiridae côtiers *Thyasira flexuosa* maintenus trois semaines en microcosme au laboratoire (Dufour & Felbeck, 2006). Cette étude a montré que la diminution des symbiotes chez les individus maintenus avec de faibles concentrations en sulfure était plus importante que chez les individus maintenus en présence de fortes concentrations en sulfure. C'est également le cas chez les Bathymodiolidae des sources hydrothermales, *Bathymodiolus azoricus*, maintenus 30 jours en laboratoire (Kádár *et al.*, 2005). Dans cette étude, les auteurs ont montré que ce bivalve pouvait survivre en absence totale de sulfure ce qui entraînait une diminution de sa population bactérienne symbiotique. Aucune de ces études n'a toutefois permis d'obtenir des individus aposymbiotiques, c'est à dire vides de tout symbiote.

Plus récemment, une étude réalisée chez *Codakia orbicularis* (Caro *et al.*, 2009) a montré, qu'en réponse à un jeûne prolongé de quatre mois, la diminution des bactéries symbiotiques détectables au CARD-FISH était d'environ 30% par mois. Chez *C. orbiculata*, une étude similaire menée durant un mois (Brissac *et al.*, 2009) a également montré une diminution des symbiotes observables au CARD-FISH. Nos travaux viennent confirmer ces résultats et les complètent, montrant que la diminution des symbiotes se poursuit dans le temps et conduit à une réorganisation du filament branchial.

De manière surprenante, le filament branchial de *L. pensylvanica* semble réagir différemment au jeûne prolongé. En effet, alors que chez *C. orbiculata* une diminution des symbiotes est

clairement observée en CARD-FISH et au MET dès les premiers mois de décolonisation, chez le soudon, après six mois de jeûne, le filament branchial observé au CARD-FISH semble pratiquement identique à celui observé chez un individu fraîchement collecté. Chez cette espèce, la population symbiotique ne diminue visiblement qu'au bout de huit mois de jeûne et nos expérimentations, pourtant menées sur quatorze mois, ne nous ont pas permis d'atteindre un niveau nul de symbiotes détectables par hybridation *in situ*. Plusieurs éléments peuvent expliquer cette différence :

(i) les symbiotes appartiennent à la même espèce bactérienne mais à des clades différents.

Une récente étude menée sur des Lucinidae philippins (*Cardiolucina quadrata* ; *Gloverina rectangularis* ; *Myrtea flabelliformis* ; *Myrtea tanimbarensis* et deux espèces non identifiées) et sur deux espèces des Antilles françaises (*Codakia orbicularis* ; *Phacoides pectinatus*) a montré l'existence de trois clades chez les symbiotes des Lucinidae (Clade A, B et C) (Brissac *et al.*, 2011). Les symbiotes de *C. orbicularis*, qui partagent le même habitat que *C. orbiculata*, appartiennent au clade A (ou SoLuc-1 pour l'espèce bactérienne symbiont of Lucinidae 1), tandis que ceux de *Phacoides pectinatus*, qui occupent un habitat proche de celui de *Lucina pensylvanica*, appartiennent au clade C (ou SoLuc-3 pour l'espèce bactérienne « symbiont of Lucinidae 3 »). Ces différences entre clades pourraient expliquer des fonctionnements métaboliques différents chez les symbiotes.

(ii) Les symbiotes hébergés par *L. pensylvanica* présentent une quantité plus importante de soufre S<sub>8</sub> que les symbiotes hébergés par *C. orbiculata*, leur permettant ainsi de survivre plus longtemps en absence de soufre dissous. Ces résultats, apportés par les analyses de spectrométrie de fluorescence X, seront développés au Chapitre 3.

(iii) Le nombre de symbiotes présents chez *L. pensylvanica* est plus important que chez *C. orbiculata*. Bien qu'aucune donnée quantitative ne soit pour le moment disponible, les observations CARD-FISH laissent à penser que le filament de *L. pensylvanica* est plus riche en bactéries que celui de *C. orbiculata*. L'observation des coupes histologiques montre également que l'espace occupé par les bactériocytes est plus important chez le soudon qui ne possède pas de cellules à grains. Ceci devra être confirmé par une analyse quantitative des populations symbiotiques qui peut être réalisée à l'aide de PCR quantitatives.

(iv) Les deux espèces hôtes gèrent différemment leurs populations symbiotiques. En cas de stress alimentaire, la réaction de l'hôte vis-à-vis du symbiote sera différente. La détection d'enzymes lysosomiales dans la vacuole entourant certaines bactéries symbiotiques du Lucinidae, *Lucina pectinata* fraîchement collecté, montre que certains hôtes peuvent digérer

leurs symbiotes (Liberge *et al.*, 2001). Ceci a également été montré chez le Mytilidae *Bathymodiolus azoricus* (Kádár *et al.*, 2008). Bien qu'aucune étude cyto-enzymatique n'ait été réalisée chez des Lucinidae ayant subi un jeûne prolongé, il est probable que chez *C. orbiculata*, il y ait consommation des bactéries symbiotiques. Brissac *et al.* (2009) ont d'ailleurs montré qu'au cours d'une période de jeûne prolongé, il y avait diminution des bactéries détectables au CARD-FISH à l'intérieur du filament branchial sans expulsion de ces dernières. Au contraire, chez *L. pennsylvanica* la relation pourrait s'en rapprocher du fait de l'absence de consommation des symbiotes.

Comme pour la décolonisation bactérienne, la recolonisation du tissu par les bactéries entraîne une réorganisation du filament branchial de *C. orbiculata*. Ainsi, nous avons observé une augmentation progressive de l'espace occupé par les bactériocytes ainsi que du contenu en symbiotes de ces cellules, après avoir remis des individus décolonisés dans leur milieu naturel (Gros *et al.*, 2011).

### 3.2.2. Techniques de détection de la prolifération cellulaire

La réalisation de cette étude a nécessité d'optimiser l'incorporation du BrdU à l'ADN eucaryote ainsi que sa détection par immunohistochimie. Il a donc fallu déterminer la concentration et le temps d'incubation adéquat. La concentration choisie, 200 µg/ml, est celle qui est généralement utilisée chez les petits vertébrés (Tighilet *et al.*, 2007) auxquels on injecte la solution deux heures avant de les sacrifier. Nous avons suivi le même protocole. Des travaux menés sur des branchies de moules font mention de concentrations plus faibles : 40 µg/ml (Tighilet *et al.*, 2007), 4 µg/ml (Martinez Exposito *et al.*, 1994). Toutefois nos premiers résultats sur coupes paraffine n'ayant pas donné satisfaction nous avons choisi de ne pas travailler à faible concentration pour limiter l'effet de ce facteur. L'incorporation du BrdU chez les bivalves est généralement réalisée par simple balnéation, car ces mollusques sont souvent de grands filtreurs. Dans notre cas, les lucines sont connues pour filtrer peu et l'essentiel de leurs apports énergétiques provient des produits de la symbiose (Fisher, 1990). Afin de nous assurer de l'incorporation du BrdU, nous avons pris soin de compléter la balnéation par l'injection d'une partie de la solution de BrdU à l'intérieur de la cavité palléale. Concernant la détection du BrdU par immunohistochimie, il a également fallu adapter le protocole, notamment pour l'étape de dénaturation de l'ADN. Celle-ci est indispensable car l'anticorps ne peut reconnaître que le BrdU présent dans l'ADN simple brin (Leif *et al.*, 2004).

Le BrdU, utilisé ici comme marqueur de la prolifération cellulaire, est avant tout un marqueur de la synthèse d'ADN puisqu'il s'y intègre en phase S du cycle cellulaire. Ceci rend possible le fait que des cellules positives au BrdU ne soient pas des cellules néo-synthétisées, mais des cellules en pleine réparation de leur ADN puisque la réparation de l'ADN nécessite la synthèse d'ADN (Gratzner, 1982; Taupin, 2007).

Nos résultats ont montré que les cellules BrdU<sup>+</sup> étaient toujours beaucoup plus nombreuses que les cellules PH3<sup>+</sup>. Ceci s'explique par le fait que : (i) le BrdU intégré en phase S du cycle cellulaire, subsiste durant la phase G2 et la phase M et, est encore détectable sur plusieurs cycles de division (Martinez Exposito *et al.*, 1994; Evarts *et al.*, 1996), (ii) l'histone 3 est phosphorylé en prophase et déphosphorylé en anaphase ce qui ne permet sa détection que sur une courte période du cycle cellulaire (Henzel *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 2005).

### 3.2.3. Techniques de détection de l'apoptose

Selon le comité de nomenclature sur la mort cellulaire, celle-ci peut résulter de phénomènes non apoptotiques (nécrose, autophagie ou kératinisation) ou apoptotiques (Kroemer *et al.*, 2009). L'apoptose, qui est un type de mort cellulaire programmée, se caractérise, entre autres, d'un point de vue biochimique, par l'activation de protéines proapoptotiques de la famille des Bcl-2, l'activation des caspases, la perméabilisation membranaire mitochondriale et la fragmentation de l'ADN. De nombreuses méthodes, basées sur la détection de ces caractères biochimiques ou sur la reconnaissance de caractéristiques morphologiques, sont utilisées pour mettre en évidence l'apoptose (Willingham, 1999; Stadelmann & Lassmann, 2000; Barrett *et al.*, 2001; Rodriguez & Schaper, 2005). La plus employée est probablement la méthode TUNEL (Rodriguez & Schaper, 2005). Cette technique est basée sur le marquage des extrémités 3'-OH libres de l'ADN par la « terminal transférase » (TdT) qui catalyse l'ajout de nucléotides dUTP couplés à un fluorochrome (Gavrieli *et al.*, 1992). Toutefois, la fragmentation de l'ADN n'est pas spécifique à l'apoptose et peut également résulter de la nécrose ou d'autres altérations de l'ADN. C'est pourquoi cette technique doit être complétée par d'autres méthodes permettant la détection des caractéristiques de l'apoptose. C'est le cas par exemple de l'activation des caspases. Dans les cellules en bonne santé, la DNase responsable de la fragmentation de l'ADN durant l'apoptose (CAD pour caspase activated DNase) forme un complexe avec son inhibiteur l'ICAD (inhibitor of caspase activated DNase). Durant l'apoptose, les caspases 3 et 7 libèrent le CAD, conduisant ainsi à la fragmentation de l'ADN (Chang & Yang, 2000). Certains auteurs ayant relaté l'activation de

caspases dans des phénomènes non létaux, il n'est pas possible de se baser uniquement sur leur détection pour mettre en évidence l'apoptose. Pour ce travail de thèse, nous avons donc choisi de combiner la méthode TUNEL et la détection de la caspase-3. De manière générale, dans nos résultats, les noyaux TUNEL<sup>+</sup> étaient toujours plus nombreux que les noyaux CASP3<sup>+</sup>. Cela peut être dû au stress environnemental qui provoquerait la fragmentation de l'ADN après un jeûne prolongé ou après un retour soudain dans l'herbier. Cela peut également s'expliquer par le fait que les fragments d'ADN sont détectables plus longtemps que la caspase 3 (D'haeseleer *et al.*, 2006).

### 3.2.4. Hypothèses permettant d'expliquer les remaniements tissulaires au sein du filament branchial de *C. orbiculata*

Les résultats obtenus chez *C. orbiculata* soulèvent plusieurs questions quant aux mécanismes sous-jacents à la plasticité cellulaire et tissulaire du filament branchial :

- **i.** Que deviennent les bactéries au cours du jeûne prolongé ?
- **ii.** D'où proviennent les bactéries détectables dans le filament branchial après retour dans l'herbier ?
- **iii.** Que deviennent les bactériocytes au cours du jeûne prolongé ? Sont-ils éliminés par apoptose ou sont-ils invisibles du fait d'une simple réduction de leur volume cellulaire ?
- **iv.** D'où proviennent les bactériocytes après retour dans l'herbier ? Correspondent-ils à des bactériocytes résiduels, jusqu'alors trop petits pour être visibles, qui auraient augmenté leur volume cellulaire ? Sont-ils issus de la multiplication de ces bactériocytes résiduels ?

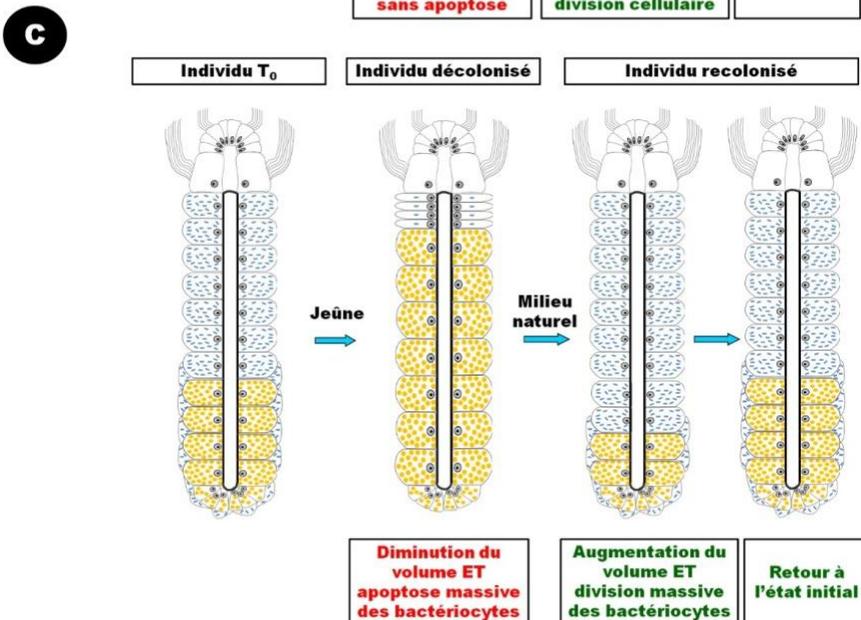
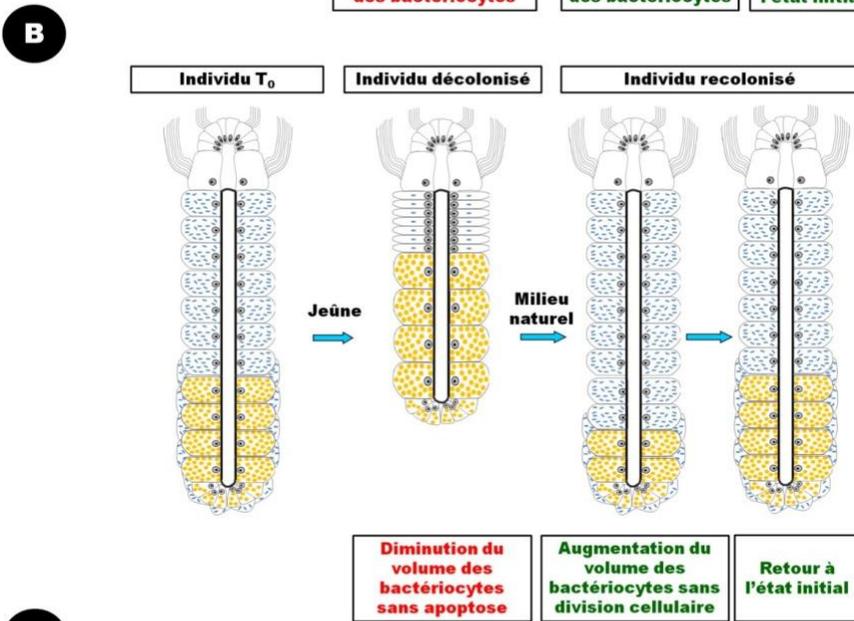
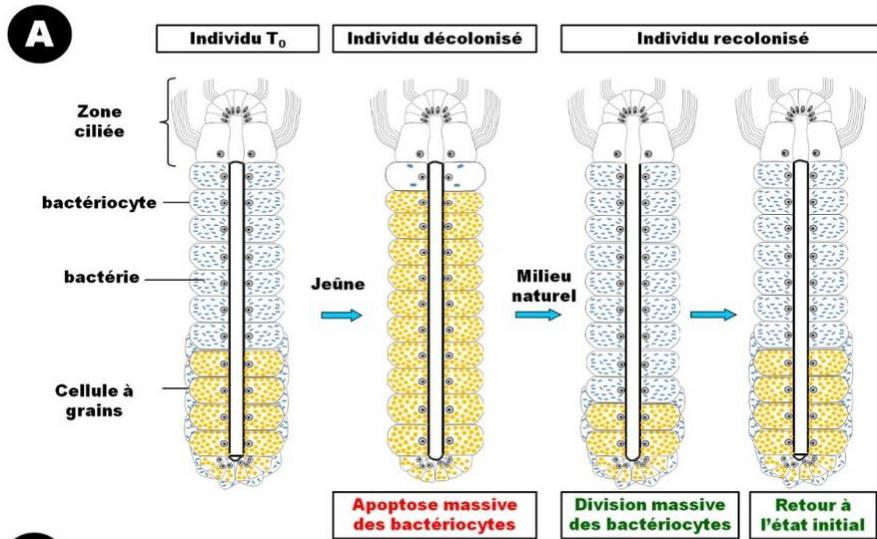
Concernant le devenir des bactéries en décolonisation (**i**), après un mois d'expérimentation, aucun rejet de symbiotes n'a pu être mis en évidence à l'aide du CARD-FISH dans l'eau des bacs contenant les Lucinidae maintenus en eau de mer filtrée (Brissac *et al.*, 2009). Ceci reste à confirmer par d'autres techniques, mais ces résultats, mis en lien avec la détection de la digestion enzymatique des bactéries intracellulaires chez un autre Lucinidae (Liberge *et al.*, 2001) nous amènent à penser qu'il pourrait y avoir digestion enzymatique des symbiotes par l'hôte. Des pistes de travail sur ce point seront développées dans le chapitre Conclusion générale et perspectives.

L'origine des bactéries en recolonisation (**ii**), sera développée au Chapitre 3.

Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer les remaniements tissulaires au sein de la zone latérale et répondre aux interrogations concernant le devenir des bactériocytes en décolonisation et leur origine en recolonisation (**iii et iv**). Quatre hypothèses, résumées à la figure 30, peuvent ainsi être émises:

- A. Le nombre de bactériocytes augmente par division cellulaire ou diminue par apoptose en fonction de la quantité de bactéries présentes dans le filament branchial. L'origine des nouvelles cellules se trouverait essentiellement dans la zone latérale.
- B. Le nombre de bactériocytes ne varie pas, mais leur volume fluctue (augmentation ou réduction) en fonction de la quantité de bactéries qu'ils ont à stocker.
- C. Le nombre et le volume de bactériocytes varient en fonction de la quantité de bactéries présentes dans le filament branchial. L'origine des nouvelles cellules se trouvant essentiellement dans la zone latérale. Cette hypothèse est en fait une combinaison des deux précédentes.
- D. Le nombre et le volume de bactériocytes varient en fonction de la quantité de bactéries présentes dans le filament branchial. L'origine des nouvelles cellules se trouvant essentiellement dans les ponts tissulaires.

La plasticité du filament branchial pouvant s'expliquer soit par la variation du volume des cellules soit par la variation de leur nombre, dans les cas où la plasticité ne résulte pas d'une variation du nombre, nous supposons qu'elle est due à une variation du volume. Ainsi, dans ces différentes hypothèses, la diminution de volume est déduite de l'absence de variation du nombre.



**D**

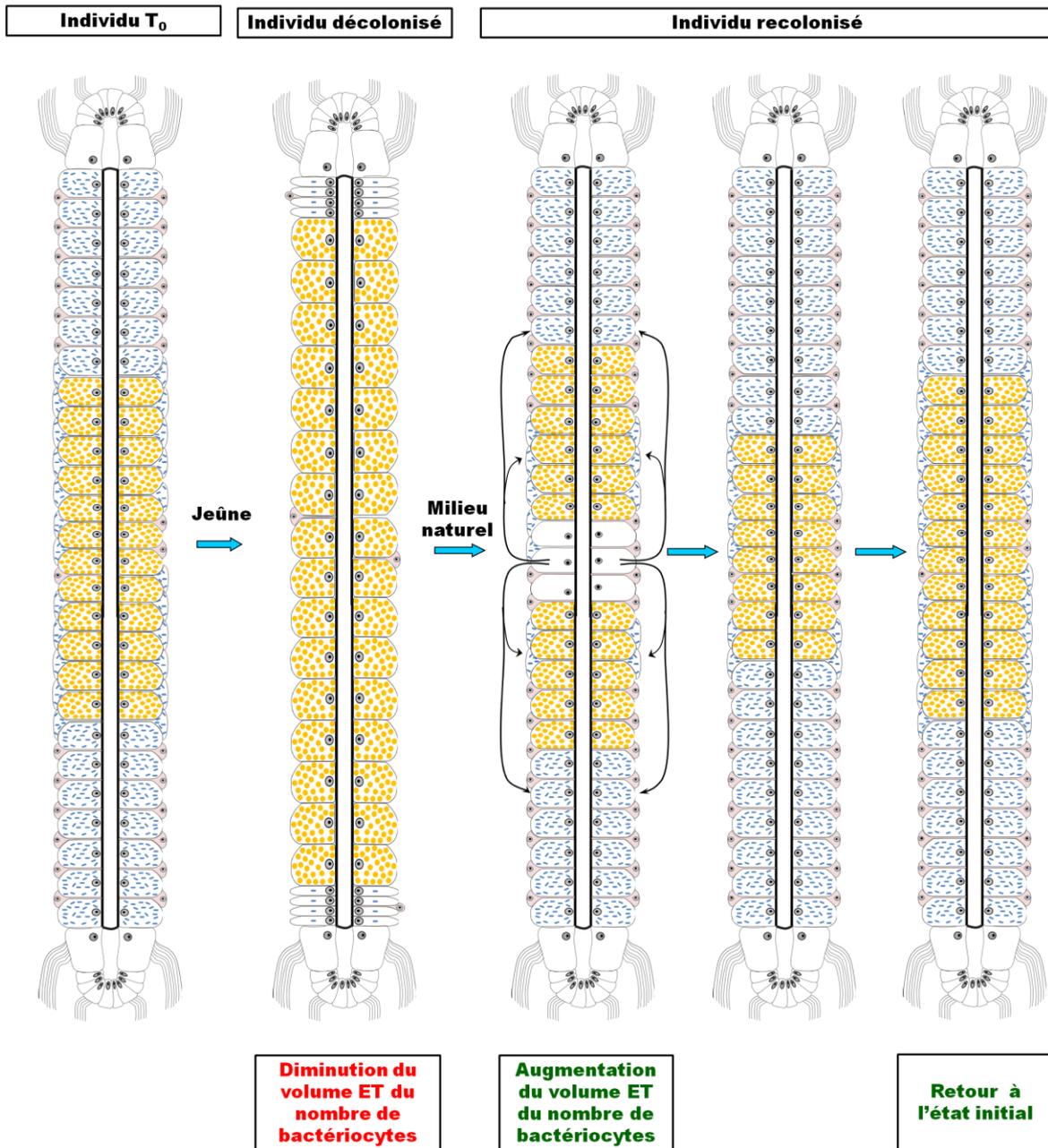


Figure 30 : Représentation schématique des quatre hypothèses permettant d'expliquer les remaniements tissulaires au sein des filaments branchiaux chez *Codakia orbiculata*.

### 3.2.5. Éléments de réponse

Les résultats obtenus durant ce travail donnent une série d'indices qui permettront de sélectionner l'hypothèse la plus probable.

Tout d'abord, nous avons montré que des **divisions éparses de cellules différenciées** pouvaient avoir lieu dans tout le filament branchial. L'importance de ce type de division varie en fonction du type cellulaire concerné et du délai de décolonisation ou de recolonisation étudié. Nous avons par exemple observé des bactériocytes BrdU<sup>+</sup> uniquement à T<sub>0</sub>, alors que les hémocytes BrdU<sup>+</sup> étaient présents à tous les délais étudiés et qu'aucune immunoréactivité au BrdU n'a été détectée au niveau des cellules à grains. Au niveau de la zone ciliée, nous avons toujours observé des cellules BrdU<sup>+</sup>. Ce qui reflète leur fort taux de renouvellement.

Deuxièmement, et de manière plus surprenante, nous avons mis en évidence l'existence d'importantes **zones de prolifération cellulaire au niveau des ponts tissulaires** de la branchie. Ces zones de prolifération, observées uniquement entre quatre et huit jours de recolonisation, semblent être des aires préférentielles de division des cellules de la branchie chez les *Codakia*. Deux types de cellules présentaient une immunoréactivité importante au BrdU et à la PH3 :

- Des cellules intercalaires reconnaissables par leur forme en trompette et leur noyau apical. Leur fonction est encore mal connue. Il a été proposé qu'elles produisent de nouveaux bactériocytes (Fiala-Médioni & Métivier, 1986; Reid & Brand, 1986). D'après nos résultats et au vu de la position de leur noyau, cette hypothèse nous semble peu probable. Il a également été proposé que ces cellules modulent la surface de contact des bactériocytes avec l'eau de mer en fonction des paramètres physico-chimiques de l'eau (Frenkiel *et al.*, 1996) mais chez *C. orbiculata* elles semblent recouvrir peu le pôle apical des bactériocytes (Gros *et al.*, 1997, Gros *et al.*, 2011).
- Des cellules indifférenciées possédant un noyau basal. Ces cellules sont vides de bactéries, de grains ou de mucus. Il pourrait s'agir de cellules indifférenciées, qui, au vu de la position de leurs noyaux, se différencieraient en bactériocytes, cellules à grains ou en mucocytes, en fonction des conditions environnementales. Elles migreront par la suite dans la zone latérale comme cela a été décrit dans l'intestin des mammifères par exemple (Sancho *et al.*, 2003). Une étude récente, menée sur les vers tubicoles profonds de la famille des Siboglinidae, a proposé l'existence d'un tissu spécifique, composé de cellules souches unipotentes qui donneront des bactériocytes dans la région centrale du trophosome (Pflugfelder *et al.*, 2009). A l'aide de la microscopie électronique à transmission, ils ont montré l'existence de bactériocytes « vides » qui pourraient correspondre aux cellules indifférenciées que nous avons observées chez *C. orbiculata*. Par analogie, nous pouvons suggérer l'existence, au niveau des ponts tissulaires de la branchie de *C. orbiculata*, d'une zone spécifique constituée de cellules indifférenciées.

Il est intéressant de mettre en relation ces données et celles obtenues par Gros *et al.* (1997; 1998) sur l'ultrastructure des filaments de juvéniles aposymbiotiques, encore dépourvus de ponts tissulaires, de *Codakia orbicularis*. Ces études ont montré l'existence de cellules indifférenciées correspondant à de futurs bactériocytes dans la zone latérale. Ces cellules, comme en attente, sont, au départ, dépourvues de bactéries et, au fur et à mesure d'un contact prolongé entre ces juvéniles et le sédiment, ces bactériocytes voient leur volume cytoplasmique augmenter pour contenir un nombre grandissant de bactéries infestant le filament branchial. Nos résultats suggèrent qu'il existe également chez l'adulte des cellules initialement vides de bactéries qui seraient capables de les acquérir au cours du temps. Toutefois, la localisation des cellules indifférenciées n'est pas la même chez le juvénile et chez l'adulte puisque, chez l'adulte, elles sont situées dans les ponts tissulaires.

Troisièmement, nous n'avons pas observé d'apoptose massive des bactériocytes après cinq mois de jeûne prolongé. Nous n'avons pas non plus observé d'apoptose massive des cellules à grains des individus aux premiers stades de recolonisation. Il faudrait toutefois étudier la mort cellulaire durant les premiers mois de jeûne, pendant lesquels les bactériocytes sont encore visibles, pour confirmer ceci.

### 3.2.6. Reconstitution du scénario et choix de l'hypothèse permettant d'expliquer les remaniements tissulaires au sein du filament branchial

A partir des trois éléments développés plus haut, le scénario de la plasticité cellulaire et tissulaire du filament branchial chez *C. orbiculata* peut être reconstitué. De manière générale, les bactériocytes existants peuvent se diviser de façon sporadique en fonction de l'abondance des symbiotes. Après un jeûne prolongé, les bactéries symbiotiques n'étant plus disponibles, certaines de ces cellules vont réduire leur volume tandis que les autres seront éliminées. L'apport de nourriture et de soufre ayant été supprimé, les produits de la digestion seront intégrés aux réserves, avant redistribution vers les différentes fonctions physiologiques. Quand les bactéries symbiotiques et la nourriture sont de nouveau disponibles dans le milieu, les bactériocytes qui avaient réduit leur volume cellulaire l'augmentent et se remplissent rapidement de symbiotes. Ceci a lieu durant les premiers jours de recolonisation, entre un et quatre jours. Entre quatre et huit jours de recolonisation, les cellules indifférenciées,

localisées au niveau des ponts tissulaires se multiplient, vont potentiellement migrer au sein de la zone latérale du filament branchial et se différencier en bactériocytes afin d'augmenter le nombre de cellules hôtes déjà en place. La production de ces cellules est si importante qu'après quinze jours de recolonisation, les bactériocytes sont plus nombreux qu'à  $T_0$ . Les cellules en excès sont éliminées par apoptose entre quinze et trente jours de recolonisation. Ainsi, l'hypothèse D (le nombre et le volume de bactériocytes varient en fonction de la quantité de bactéries présentes dans le filament branchial. L'origine des nouvelles cellules se trouvant essentiellement dans les ponts tissulaires) correspondrait au scénario le plus probable pour expliquer les remaniements tissulaires au sein de la zone latérale.

Chez le Veneridae *Mercenaria mercenaria*, en utilisant l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA), Hanselmann *et al.* (2000) ont montré l'existence de cellules épithéliales prolifératives à la base des branchies. Des cellules éparses, en prolifération, ont également été observées tout au long de l'épithélium branchial de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Gómez-Mendikute *et al.*, 2005). Toutefois, aucune étude sur les bivalves n'a clairement établi l'existence de plusieurs voies de régénération des cellules de la branchie. Notre étude est la première à rapporter le fait que le renouvellement du tissu branchial et notamment des bactériocytes, se fait à la fois par multiplication de bactériocytes existants et par différenciation de cellules indifférenciées. L'existence de plusieurs mécanismes de régénération a déjà été démontrée dans plusieurs autres tissus. C'est le cas, par exemple, au niveau des vaisseaux sanguins, où la régénération peut se faire grâce à des cellules endothéliales préexistantes ou grâce à des cellules progénitrices endothéliales (Tepper *et al.*, 2003). Les cellules progénitrices résultent de la division asymétrique de cellules souches, donnant une cellule souche et une cellule progénitrice déterminée, laquelle ne donnera que des cellules spécialisées. Les sources d'hépatocytes impliqués dans la croissance du foie sont également multiples. Les nouveaux hépatocytes proviennent de la réplique d'hépatocytes déjà présents dans le tissu, mais aussi des cellules progénitrices et des cellules souches (Fausto, 2004).

L'éclaircissement des mécanismes qui sous-tendent la plasticité tissulaire du filament branchial des lucines, révèle la complexité de ces processus. Ces phénomènes de plasticité combinent prolifération, apoptose et variation du volume cellulaire afin de maintenir l'homéostasie du tissu et de contrôler la population symbiotique.

### 3.2.7. Cas des Hémocytes

Nous avons constaté la présence de cellules dans la lacune sanguine du filament branchial. Ces cellules correspondent à des hémocytes. Chez les bivalves, leur rôle varie d'un type cellulaire à l'autre (Hine, 1999), mais ils jouent souvent un rôle dans la phagocytose, la réponse immunitaire, et la reconnaissance de particules étrangères. L'immunoréactivité au BrdU et à la PH3 de ces cellules permet de dire qu'elles sont capables de se diviser dans la lacune sanguine, suggérant que leur prolifération n'est pas cantonnée à un organe ou à une zone spécifique, tel que cela a été décrit chez les crustacés (Johansson *et al.*, 2000). Cette information vient confirmer les résultats d'études précédentes menées sur des bivalves de la famille des Veneridae, *Mercenaria mercenaria* (Hanselmann *et al.*, 2000) et *Ruditapes philippinarum* (Matozzo *et al.*, 2008) et de la famille des Mytilidae du genre *Mytilus* (Zaldibar *et al.*, 2004; Gómez-Mendikute *et al.*, 2005; Mayrand *et al.*, 2005).

D'une manière générale, nos données expérimentales, obtenues par la méthode TUNEL ou par le marquage de la caspase 3, concernant la mort cellulaire des hémocytes, sont convergentes. La mort cellulaire des hémocytes a un niveau basal relativement élevé, comme le confirment les résultats obtenus chez les palourdes témoins ( $T_0$ ), et les palourdes en recolonisation bactérienne dans l'herbier ( $T_{5+8j}$  et  $T_{5+15j}$ ). Cette forte mobilisation des hémocytes, en permanence, pourrait refléter leur rôle immunitaire, et leur participation au contrôle de la population bactérienne intégrée dans les bactériocytes avec leur capacité de phagocytose.

C'est au délai de jeûne de 5 mois ( $T_5$ ) que nos résultats sont les plus remarquables. Une forte prolifération cellulaire de ces cellules est associée à une mort cellulaire importante de ces mêmes cellules. Ces résultats sous-tendent le fait que les hémocytes sont sensibles aux effets de jeûne induits par le maintien en laboratoire en absence de soufre réduit et de nourriture, ce qui entraînerait une forte mortalité de ces cellules. Parmi les études portant sur les effets des conditions environnementales sur le système immunitaire des bivalves, quelques unes se sont intéressées à l'effet du régime alimentaire sur les hémocytes (Carballal *et al.* 1998 ; Hégaret *et al.* 2004 ; Delaporte *et al.* 2006). Toutefois, peu d'études se sont intéressées à l'effet des restrictions alimentaires. C'est le cas de trois études menées sur des bivalves (Oubella *et al.* 1993 ; Delaporte *et al.* 2006 ; Butt *et al.* 2007) qui ont montré que les restrictions alimentaires avaient des conséquences sur le système immunitaire des bivalves en mettant en évidence une diminution du nombre d'hémocytes. Une étude menée chez *C. virginica* a également montré

que le jeûne total conduisait à une diminution de la taille et de la viabilité des hémocytes (Hégaret *et al.* 2004).

Les hémocytes des bivalves sont capables de phagocyter des éléments étrangers à la cellule, comme des bactéries pathogènes (Oubella *et al.*, 1996; Allam *et al.*, 2001), des particules de latex (Nakayama *et al.*, 1997) et des particules de carbone (Reade & Reade, 1976). Leur rôle putatif dans l'élimination des déchets, suggéré par Reade & Reade (1976), pourrait expliquer le fort taux de division de ces cellules à T<sub>5</sub>, qui serait dû à une importante quantité de matériel à dégrader (bactéries, cellules du filament branchial). La concomitance de la prolifération des hémocytes et de leur mort pourrait s'expliquer par un fort taux de renouvellement de ce type cellulaire au cours du jeûne. Le turnover important observé au niveau des cellules immunitaires pourrait également s'expliquer par un mauvais état de santé des bivalves après 5 mois de jeûne. Toutefois des études supplémentaires manquent pour mieux comprendre la longévité des cellules de l'hémolymphe des bivalves (Hégaret *et al.* 2004 citant Cheng, 1996).

### 3.3. Suivi des protéines

La capacité d'un organisme à résister à des périodes de jeûne dépend de la quantité de réserves nutritives qu'il possède, mais également de la réponse adaptative au stress alimentaire qu'il adopte. Celle-ci peut être comportementale et/ou physiologique. Dans le cas des Lucinidae, l'étude du comportement s'avérant difficile, nous nous sommes intéressés à l'étude de la physiologie. En cas de jeûne, le principal changement physiologique est la perte de masse liée à l'utilisation des trois principaux « carburants physiologiques » que sont les protéines, les lipides et les glucides.

Un animal bien nourri, qui n'est pas en phase de croissance, maintient une balance protéique neutre dans laquelle le taux de protéines synthétisées est égal au taux de protéines dégradées, tandis qu'un animal privé de nourriture présente une balance négative, où la dégradation des protéines est en excès par rapport à leur synthèse.

Chez le rat *Rattus norvegicus*, des expériences de jeûne menées sur une longue période ont montré une diminution de 29% des protéines totales (Cherel *et al.*, 1992). Chez les vertébrés marins, la consommation des protéines constitutives de l'organisme en cas de jeûne est également observée dans diverses expériences menées chez les Téléostéens et notamment chez la perche barramundi, *Lates calcarifer* (Glencross & Bermudes, 2011). Cette étude a

également montré que la perte en protéines est accentuée par l'augmentation de la température de l'eau.

Bien que beaucoup moins étudiées, les conséquences du jeûne chez les invertébrés marins semblent très proches de celles retrouvées chez les vertébrés pour ce qui est des protéines. Chez les Veneridae *Ruditapes decussatus* et *Venerupis pullastra* au bout de 84 jours de jeûne, les concentrations en protéines de l'ensemble du corps, ont diminué respectivement de 20 et 40% (Albentosa *et al.*, 2007). Chez les Mactridae *Rangia cuneata*, après 134 jours d'inanition les protéines ont été utilisées à 60% par tout l'organisme (Lane, 1986). Chez l'huître *Crassostrea gigas* après 175 jours de jeûne, Riley (1976) observe une diminution de 55% de la concentration en protéines dans l'ensemble du corps et de 25% dans la branchie. Toujours chez *C. gigas*, après 405 jours, Whyte *et al.* (1990) observent une diminution de 67% des protéines du corps.

Chez le modèle symbiotique *Codakia orbiculata*, nos résultats sont en accord avec ce schéma puisque nous avons observé une diminution de 46,7% de la concentration en protéines des branchies, durant les quinze mois (450 jours) de jeûne. Toutefois, chez *L. pensylvanica*, entre T<sub>0</sub> et T<sub>6</sub> on observe une diminution de seulement 4,6%. Chez l'isopode *Stenasellus virei*, après 180 jours de privation de nourriture la concentration en protéines totales du corps diminue de 20% tandis que cette valeur atteint 20% en seulement 28 jours chez l'isopode *Asellus aquaticus* (Hervant & Renault, 2002). Cette dernière espèce adopte une réponse monophasique caractérisée par une diminution linéaire et importante de toutes ses réserves énergétiques, tandis que *S. virei* adopte une réponse en trois phases, utilisant successivement les différentes réserves. On peut supposer que les différences observées entre nos deux modèles symbiotiques peuvent s'expliquer de la même manière. En effet, il se peut que *L. pensylvanica* utilise successivement les principaux « carburants physiologiques » et que l'utilisation des protéines soit tardive. D'ailleurs, de nombreux spécialistes des effets du jeûne considèrent les protéines comme étant le carburant de dernier recours (McCue, 2010). *C. orbiculata* pourrait au contraire utiliser bien plus rapidement ses réserves de protéines. L'hypothèse d'une réponse monophasique rapide, telle celle présentée chez *A. aquaticus*, semble peu probable vu la longévité des lucines en cas de jeûne. Des données supplémentaires restent à acquérir sur l'utilisation des lipides et des glucides dans nos modèles symbiotiques en décolonisation.

Le délai maximum de jeûne chez les bivalves que nous avons trouvé dans la bibliographie est de 405 jours. Il concerne l'espèce non symbiotique *Crassostrea gigas* (Whyte *et al.*, 1990). *C. orbiculata* peut rester 450 jours sans apport de nourriture. La présence de symbiotes

pourrait être une source supplémentaire d'énergie consommable par *C. orbiculata* en cas de jeûne. Pour information, en dehors des cas d'hibernation, le record chez les vertébrés est détenu par l'anguille européenne *Anguilla anguilla*, capable de rester jusqu'à 1594 jours sans se nourrir (Olivereau & Olivereau, 1997).

**CHAPITRE 3 : ETUDE DU MODE  
D'ACQUISITION DES SYMBIOTES ET  
DE LEUR PLASTICITE**



# **1. Matériel et méthodes**

## **1.1. Matériel biologique**

Les expériences conduites dans le cadre de l'étude du mode d'acquisition des symbiotes ont été réalisées uniquement chez l'espèce *Codakia orbiculata*, tandis que les expériences menées dans le cadre de l'étude de la plasticité des symbiotes concernaient à la fois *C. orbiculata* et *Lucina pensylvanica*.

### **1.1.1. Collecte des échantillons, conditions de maintien et de réinfection**

Les individus de l'espèce *C. orbiculata* ont été collectés dans l'herbier à *Thalassia testudinum* de l'îlet Cochon en Guadeloupe tandis que les individus de l'espèce *L. pensylvanica*, ont été collectés dans l'herbier à *T. testudinum* de la presqu'île du François, en Martinique. Les individus sont repérés dans l'herbier à l'aide de tournevis et de coutelas, puis ont été récupérés à la main.

Les individus prélevés ont été maintenus au laboratoire dans les mêmes conditions que celles décrites pour le jeûne au Chapitre 2. Chaque mois, plusieurs individus ont été prélevés au hasard pour analyser les branchies en CARD-FISH, en cytométrie en flux et par spectrométrie de fluorescence X (Figs. 31 ; 32).

Après une période de jeûne de 6 mois ( $T_6$ ), les symbiotes n'étant plus détectables chez *C. orbiculata*, des individus ont été utilisés pour des expériences de réinfection allant de 2 à 31 jours ( $T_{6+2j}$  à  $T_{6+31j}$ ) comme décrit au Chapitre 2. Les individus ainsi récupérés ont servi aux expériences d'acquisition des symbiotes (actine, BrdU, CARD-FISH), et de caractérisation des symbiotes par la cytométrie en flux et par la spectrométrie de fluorescence X (Fig. 31).

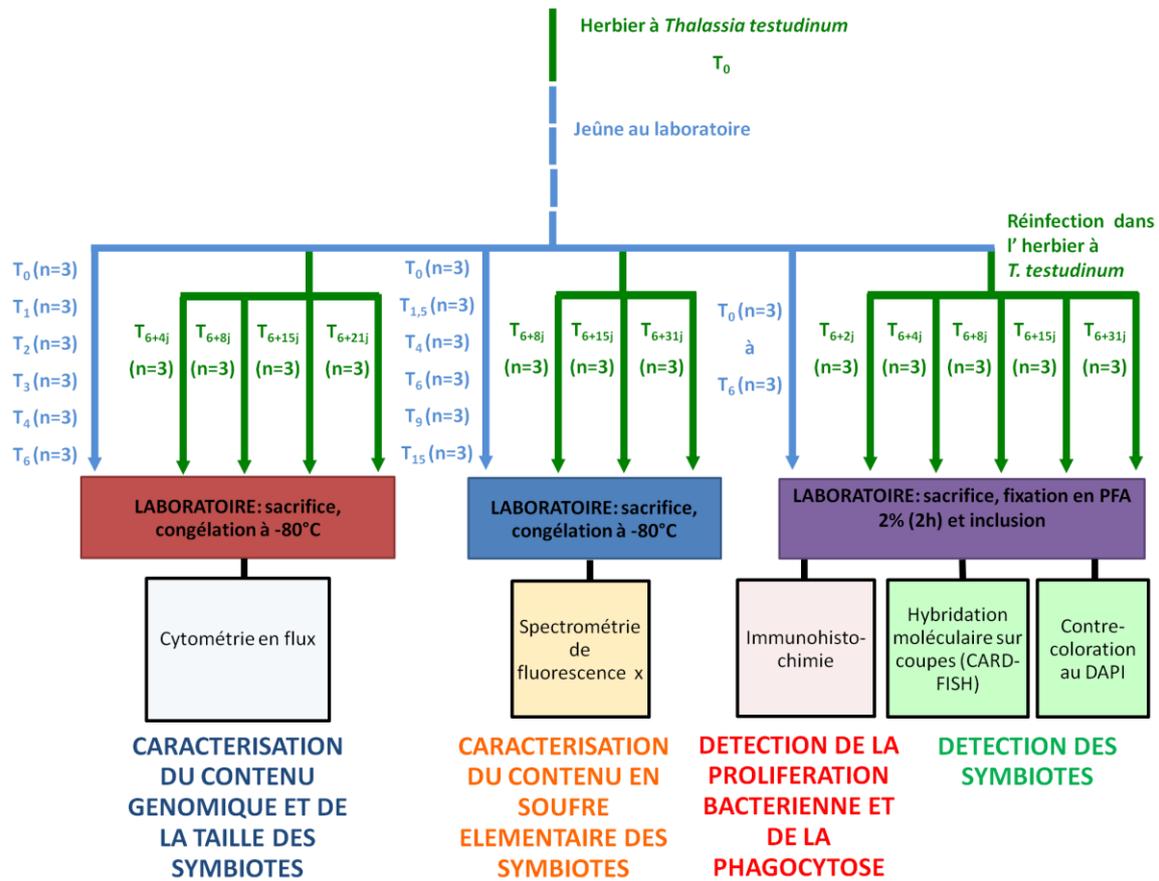


Figure 31 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en œuvre chez *Codakia orbiculata* dans l'étude du mode d'acquisition des symbiotes et de leur plasticité.

Les flèches vertes correspondent aux périodes de vie dans l'herbier, les flèches bleues correspondent aux périodes de jeûne en laboratoire. Le temps de jeûne est indiqué en mois (e.g. T<sub>6</sub>=6 mois de jeûne) et le retour dans l'herbier en mois de jeûne + jours dans l'herbier (e.g. T<sub>6+4j</sub>=6 mois de jeûne remis 4 jours dans l'herbier).

En parallèle, 3 bacs de 5 individus servant de témoins aux expérimentations de réinfection, ont été maintenus au laboratoire pendant 21 jours (T<sub>6+21j</sub>), i) en eau de mer filtrée à 0,22 µm avec ajout de sulfure tous les 2 jours (à une concentration finale de Na<sub>2</sub>S de 50 µM), ii) en eau de mer filtrée à 0,22 µm avec ajout de nourriture sous forme d'un mélange d'algues unicellulaires (80% de *Nannochloropsis* sp. et 20% de *Isochrysis tahiti* à une concentration de 1000 cellules/ml), iii) en eau de mer filtrée à 0,22 µm avec à la fois ajout de sulfure et de nourriture.

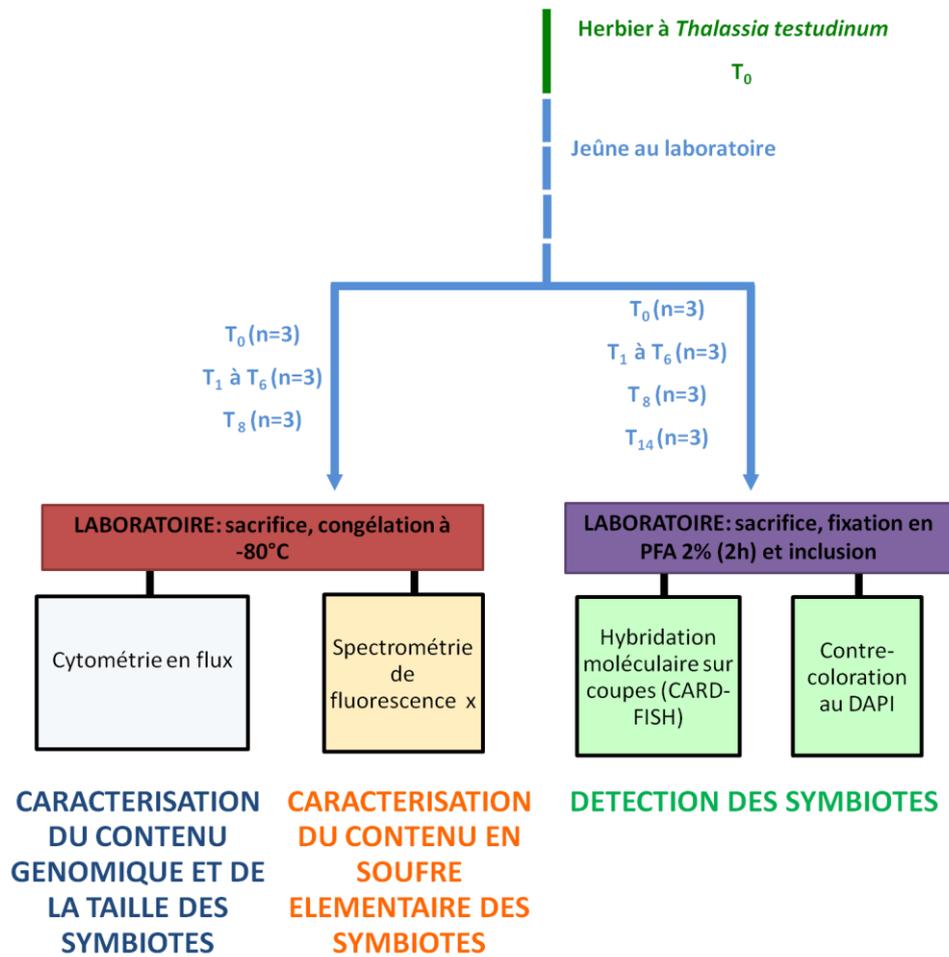


Figure 32 : Représentation schématique du protocole expérimental mis en œuvre chez *Lucina pensylvanica* dans l'étude de la plasticité des symbiotes.

Les flèches vertes correspondent aux périodes de vie dans l'herbier, les flèches bleues correspondent aux périodes de jeûne en laboratoire. Le temps de jeûne est indiqué en mois (e.g. T<sub>6</sub>=6 mois de jeûne).

Les individus *C. orbiculata*, non utilisés pour les expériences de réinfection ont été maintenus en condition de jeûne jusqu'à 15 mois. La durée des expériences de jeûne pour les individus *L. pensylvanica* a été de 14 mois.

## 1.2. Techniques de détection du mode d'acquisition des symbiotes

### 1.2.1. Détection de la phagocytose

#### *Protocole d'immunolocalisation de l'actine*

Les coupes sont débarassées du milieu d'inclusion et réhydratées. Elles ont ensuite pré-incubé dans une solution-tampon de PBS à 0,1 M contenant 2% de BSA ou Bovine Serum Albumin, et 0,3% de Triton X-100, pendant 2 heures, à température ambiante. Les coupes ont ensuite incubé en présence de l'anticorps primaire polyclonal anti-actine (Stressgen<sup>®</sup>) (dilution 1 :500), pendant 2 heures, à température ambiante. Puis, l'excès d'anticorps primaire est rincé dans 2 bains successifs de PBS à 0,1 M, pendant 10 minutes. Les coupes ont alors incubé en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin (Stressgen<sup>®</sup>) (dilution 1 :200), pendant 1 heure, à température ambiante. L'élimination de l'excédent en anticorps secondaire se fait par deux rinçages successifs de 10 minutes chacun dans du PBS à 0,1 M. L'étape d'amplification du signal immunohistochimique démarre avec l'incubation des coupes dans 1 ml de tampon d'amplification contenant 10 µl d'eau oxygénée et 2 µl de tyramide-FITC, pendant 15 minutes, à 37°C, et à l'obscurité. La tyramide a la particularité d'interagir avec les molécules de HRP couplées à l'anticorps secondaire, ce qui permet d'amplifier le signal. Les coupes sont ensuite rincées dans du PBS à 0,1 M pendant 10 minutes, dans de l'eau distillée pendant une minute, puis passées à l'éthanol à 95% pendant 1 min.

### 1.2.2. Détection de la prolifération bactérienne

#### *Protocole d'immunolocalisation du BrdU dans les cellules procaryotes*

Afin de savoir si le BrdU peut s'intégrer à l'ADN procaryote, des bactéries de type gram-négatif *Escherichia coli* et *Citrobacter* sp. en phase de latence ont été cultivées sur milieu liquide TSB (Trypticase Soy Broth, pH= 7.3 ± 0.2, durant 2 heures, à 37°C). En phase de croissance exponentielle, elles ont incubé en présence d'une solution de BrdU (Sigma<sup>®</sup>) à 200 µg/ml réalisée en PBS 1X pendant 2 heures et 5 heures à 37°C. Les bactéries sont ensuite fixées durant 2 heures à 4°C, dans une solution de PFA à 2% en PBS 1X. Elles sont ensuite

centrifugées 2 minutes à 8000 g. Une fois le surnageant éliminé, le culot bactérien est de nouveau suspendu en PBS 1X. Il servira à la réalisation d'un frottis bactérien sur lequel on effectuera la détection immunohistochimique du BrdU selon le même protocole que celui utilisé pour la détection de l'actine, en utilisant l'anticorps primaire anti-BrdU monoclonal de chez Dako<sup>®</sup> (650 mg/l, dilution 1/500) et l'anticorps secondaire anti-souris de chez AnaSpec<sup>®</sup> (dilution 1/200).

A chaque délai de réinfection analysé, 3 individus issus du protocole de réinfection ont incubé dans une solution de BrdU (Sigma<sup>®</sup>) à 200 µg/ml réalisée en eau de mer filtrée à 0,22 µm, pendant 2 heures à température ambiante. Les branchies sont ensuite fixées dans une solution de PFA diluée à 2% dans de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm, pendant 3 heures à 4°C. Elles sont ensuite déshydratées et incluses. Les coupes de 5 µm subissent ensuite le protocole d'immunolocalisation du BrdU qui comprend une étape de pré-incubation dans une solution-tampon de PBS à 0,1 M contenant 2% de BSA et 0,3% de Triton X-100 pendant 5 heures, à température ambiante. Vient ensuite un bain de Tris-Protéinase K à 0,5 µg/ml de 5 minutes à 37°C. Les coupes sont rincées en HCl 0,1 N à 4°C, pendant 10 minutes avant d'incuber en HCl 2 N, pendant 1 heure. Après rinçage les coupes ont incubé en présence de l'anticorps primaire, pendant 2 heures, à température ambiante. Les coupes sont ensuite rincées dans du PBS 0,1 M pendant 10 min, dans de l'eau distillée pendant 1 minute puis à l'éthanol à 95% pendant 1 minute avant d'être montées entre lames et lamelles.

Afin de mettre en évidence l'ADN symbiotique procaryote, les milieux de montage de toutes les lames issues des protocoles d'immunohistochimie, ont été complétés avec du DAPI (100 µg/ml) qui est un marqueur de l'ADN. Les observations se font au microscope à épifluorescence, microscope Nikon<sup>®</sup> Eclipse 80i, auquel est associée une caméra CCD Nikon<sup>®</sup> DXM 1200F.

### 1.3. Techniques de détection des symbiotes

#### 1.3.1. CARD-FISH

Les échantillons ont été traités selon le protocole de Pernthaler *et al.* (2002). Ce protocole est décrit au chapitre 2. A la fin de l'hybridation, le signal est amplifié. Les coupes sont montées entre lames et lamelles dans un milieu de montage complété avec du DAPI (100 µg/ml) afin

de marquer l'ADN. Elles sont ensuite observées au microscope à épifluorescence microscope Nikon® Eclipse 80i, auquel est associée une caméra CCD Nikon® DXM 1200F.

## 1.4. Techniques de caractérisation des symbiotes

### 1.4.1. Caractérisation du contenu en soufre élémentaire des symbiotes par la spectrométrie de fluorescence X

#### *Principe*

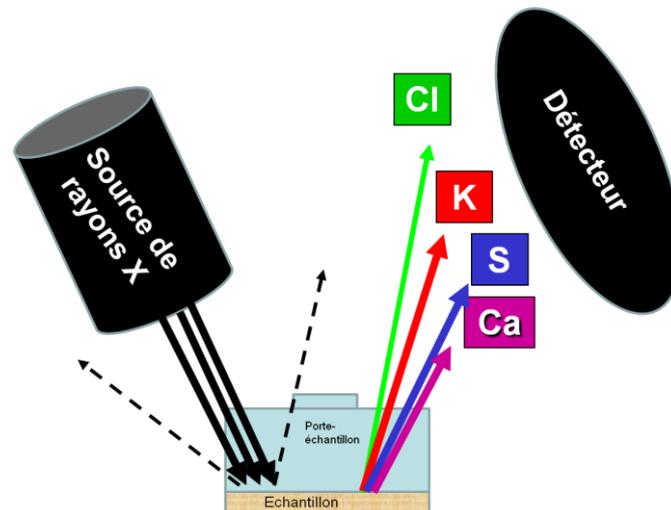


Figure 33 : Représentation schématique du principe de la spectrométrie de fluorescence X.

L'échantillon est soumis à des rayonnements émanant d'un tube à rayons X. Une faible proportion des rayons X n'est pas absorbée (flèches discontinues) et est rétrodiffusée. Les rayons X absorbés vont, eux, exciter les couches internes des atomes de l'échantillon en leur transmettant leur énergie. Cette énergie sera réémise sous forme de photons X caractéristiques dont la détection puis l'analyse permettront de déterminer la composition élémentaire de l'échantillon. Dans ce travail de thèse, il s'agit entre autres, de la détection du chlore (Cl), du potassium (K), du calcium (Ca) et du soufre (S).

Cette technique a été réalisée en collaboration avec Thierry Césaire et Jean-Louis Mansot du laboratoire GTSI (Groupe de Technologie des Surfaces et des Interfaces) de l'Université des Antilles et de la Guyane. La spectrométrie de fluorescence X (Fig. 33) est une technique d'analyse élémentaire couramment utilisée depuis les années 50. Elle permet, après une préparation relativement simple des échantillons, d'en déterminer qualitativement et quantitativement la composition chimique et ce, même pour des mélanges difficilement séparables.

Dans le cadre de ce travail de thèse, la spectrométrie de fluorescence X a été utilisée pour déterminer le soufre élémentaire présent dans la branchie. Cette technique ne permettant pas

de distinguer les formes chimiques des éléments, nous avons contourné ce problème en adaptant le protocole. Pour chaque analyse, l'échantillon est divisé en deux fractions identiques : l'une est traitée à l'éthanol absolu pour extraire de manière sélective le soufre élémentaire  $S_8$  associé aux bactéries endosymbiotiques sulfo-oxydantes et l'autre non. Pour chaque échantillon, la concentration en soufre élémentaire  $S_8$  a été obtenue en soustrayant la valeur obtenue pour la fraction de l'échantillon traité à l'éthanol, de la valeur obtenue pour la fraction non traitée.

### *Protocole*

Toutes les portions de branchies utilisées pour ces analyses avaient une masse humide minimale de 22 mg pour *C. orbiculata* et de 100 mg pour *L. pensylvanica*. Les branchies ont été homogénéisées en eau de mer filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$  grâce à un broyeur de Dounce<sup>®</sup>. Les broyats sont réalisés de façon à obtenir un volume final de 3 ml dont la concentration est de 7,33 mg/ml pour *C. orbiculata* et de 22,22 mg/ml pour *L. pensylvanica*. Les 3 ml de solution sont répartis en deux fractions égales auxquelles sont ajoutées respectivement 1,5 ml d'eau de mer filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ . Les échantillons sont centrifugés à 10 000 g pendant 2 minutes, à 4°C. Une fois le surnageant évacué, les culots sont mis en éthanol absolu pour la première fraction et en eau de mer pour la seconde pendant 15 minutes. Après centrifugation, l'opération est renouvelée 3 minutes, puis l'ensemble des échantillons est rincé en eau de mer filtrée. 3 ml d'échantillons sont placés dans des porte-échantillons adaptés, puis analysés au spectromètre de fluorescence X Panalytical<sup>®</sup> Axios PW2400 dont l'anode du tube à rayons X est en rhodium (Rh). Les résultats sont traités à l'aide du logiciel Super Q.

## **1.4.2. Caractérisation du contenu génomique et de la taille des symbiotes par la cytométrie en flux**

### *Principe*

La cytométrie en flux (CMF) est une technique qui permet une analyse multiparamétrique de cellules isolées entraînées par un flux liquide (Fig. 34). L'échantillon contenant les cellules à analyser est aspiré par une buse dans un conduit du cytomètre en flux contenant du liquide de gaine. Le liquide de gaine provoque l'alignement des cellules en suspension. Celles-ci passent les unes après les autres devant un laser d'argon ( $\lambda_{\text{exc}} = 488\text{nm}$ ). Elles émettent alors deux

types de signaux : 1) la diffraction aux grands angles (SSC : side scatter) donnant la taille relative des cellules (proportionnelle à la taille et à la granulosité du cytoplasme) et 2) la fluorescence FL1 suite au marquage des cellules par le fluorochrome Sybr Green I.

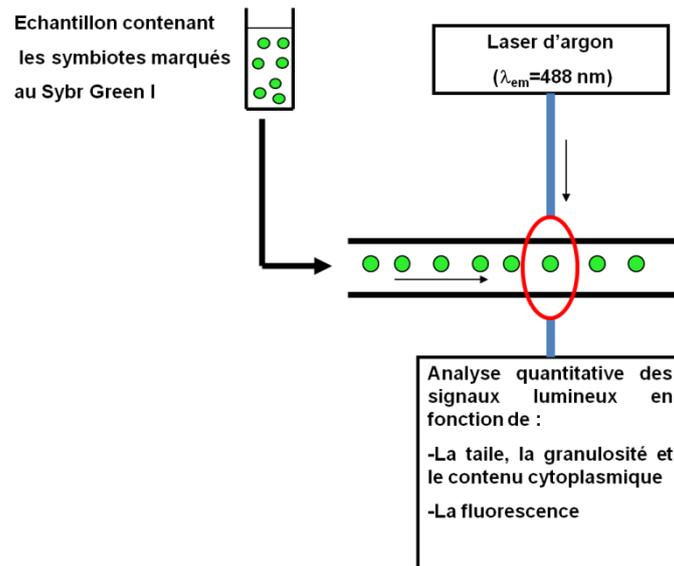


Figure 34 : Représentation schématique du principe de la cytométrie en flux.

Chaque cellule analysée est affectée d'une valeur de SSC et d'une valeur de FL1, et apparaît sous forme de point sur une représentation graphique appelée « cytogramme » ; l'ensemble des cellules d'une population apparaît sous forme d'un nuage de points (représentation en « dot plot »). Le cytogramme brut en « dot plot » peut être converti en « contour plot » ou courbes d'isodensité par le logiciel d'analyse Cell Quest.

Pour cette étude, les échantillons ont été préparés au laboratoire et l'analyse en cytométrie en flux a été réalisée par Audrey CARO et Patrice GOT du Laboratoire Ecologie des Systèmes Marins Côtiers de l'université de Montpellier II. Le cytomètre utilisé est le FacsCalibur (Becton Dickinson®) qui possède un laser d'argon dont la longueur d'onde d'excitation est de 488 nm. Cet appareil permet de détecter : la fluorescence rouge (FL3 :  $\lambda_{em} > 670$  nm), la fluorescence orange (FL2 :  $543 \text{ nm} < \lambda_{em} < 627$  nm) et la fluorescence verte (FL1  $500 \text{ nm} < \lambda_{em} < 560$  nm), caractéristique du fluorochrome utilisé, ici le Sybr Green ( $\lambda_{em}=530$  nm).

### *Protocole*

Avant de procéder à l'analyse par cytométrie en flux, les endosymbiotes sont extraits des branchies et purifiés selon le protocole décrit par Caro *et al.* (2007). Pour ce faire, les branchies sont disséquées, puis homogénéisées dans 3,5 ml d'eau de mer filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$  grâce à un broyeur de Dounce<sup>®</sup>. Toutes les étapes qui suivent sont réalisées à 4°C pour éviter la multiplication d'éventuelles bactéries contaminantes. L'homogénat est centrifugé à 30 g pendant 1 minute, puis le surnageant est centrifugé à 400 g pendant 2 minutes. Le culot, qui concentre les bactéries, est suspendu dans 1,5 ml d'eau de mer filtrée. Cette suspension est déposée sur un gradient de Percoll (Sigma<sup>®</sup>) dilué en tampon imidazole 2,5X, dont la concentration varie en fonction de l'espèce et de la durée du jeûne. En effet, cette méthode de purification est basée sur les différences de densité entre le symbiote et les organites des cellules hôte. Le jeûne provoquant une diminution de la densité des symbiotes due à une perte en S<sub>8</sub>, la concentration de Percoll fixée à 60% chez les T<sub>0</sub> est ajustée au cours de l'expérience. Aux stades les plus avancés de jeûne, la concentration en Percoll était de 30%. Une fois déposée sur le gradient, la suspension est centrifugée à 1000 g pendant 6 minutes. Le culot est rincé dans 1 ml d'eau de mer filtrée puis centrifugé à 400 g, pendant 2 minutes. Une fois le surnageant évacué, le culot est suspendu dans 1,6 ml d'eau de mer filtrée et fixé en PFA à 1%, 1 à 2 heures, à 4°C avant d'être conservé à -80°C jusqu'à analyse.

Une fois les symbiotes purifiés, leur taille relative et leur contenu en acide nucléique ont été analysés par cytométrie en flux. La solution purifiée est diluée (1/1000) en eau de mer. Les acides nucléiques sont marqués à l'aide du SYBR green I (Molecular Probes, Eugene, OR) dilué au 10 000<sup>ème</sup> selon la méthode décrite par Marie *et al.* (1997). Deux lots de billes fluorescentes (1 et 2  $\mu\text{m}$ ) (Polysciences, Inc.), servant de référence de taille pour les symbiotes, sont ajoutés aux échantillons. Des billes, non fluorescentes, de concentrations connues, nommées TrueCount (Becton Dickinson Biosciences), sont également ajoutées aux échantillons. Elles permettront de déduire le volume analysé. Le liquide de gaine (NaCl 30%) est filtré sur une membrane de 0,22  $\mu\text{m}$ . Les analyses sont effectuées à faible vitesse (18  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) et l'acquisition s'effectue pendant 2 minutes, correspondant à environ 20 000 cellules analysées. La fluorescence des symbiotes marqués au SYBR Green I, reflète leur contenu en acides nucléiques et est détectée via le canal FL1 (530 nm). Le SSC est utilisé comme indicateur de la taille relative des cellules.

## **2. Résultats**

### **2.1. Variation du nombre de symbiotes détectables au CARD-FISH**

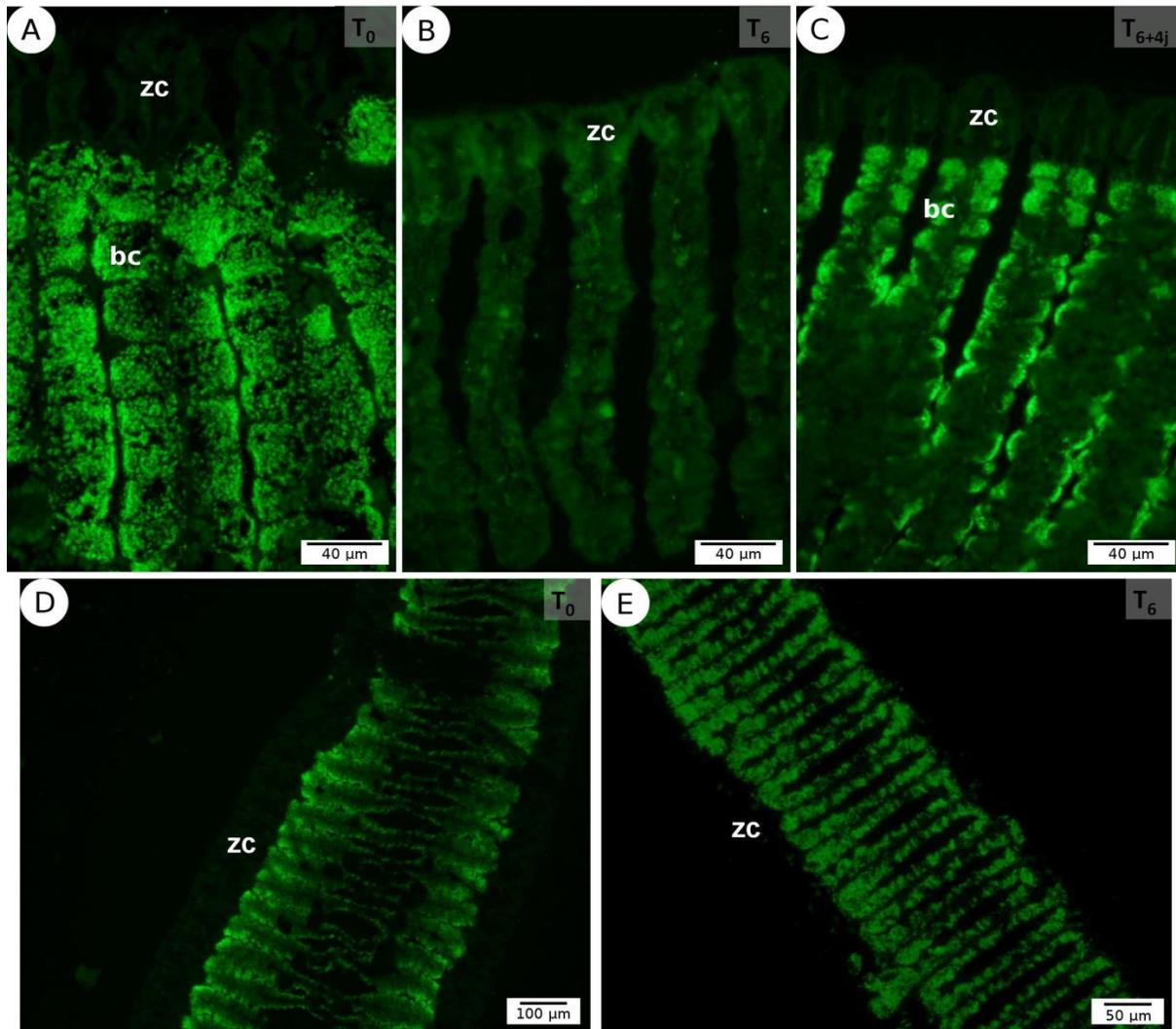
Nous avons montré au Chapitre 2, que chez *Codakia orbiculata* (Figs. 35A-C), le nombre de bactéries endocellulaires détectables par hybridation CARD-FISH diminuait progressivement au fil des mois de jeûne. Au bout de 6 mois de jeûne, il n'y a plus de bactéries, détectables à l'aide du CARD-FISH ou des marqueurs ADN/ARN, dans les bactériocytes. Les individus, vides de symbiotes détectables par les techniques employées au cours de ce travail, replacés dans leur biotope naturel, présentent à nouveau des bactéries détectables dans les bactériocytes. Les résultats des expériences de jeûne et de réinfection ont été répétés sur 15 lots différents d'environ 70 *C. orbiculata*, prélevés de l'herbier à différents moments de l'année. Chez *Lucina pensylvanica* (Figs. 35D-E), après 6 mois de jeûne, le nombre de bactéries symbiotiques détectables par les mêmes méthodes, ne semble pas diminuer.

### **2.2. Mode d'acquisition des bactéries symbiotiques**

Les expériences préliminaires réalisées pour élaborer le protocole expérimental d'immunolocalisation de l'actine et du BrdU nous ont montré que les durées de fixation en PFA de 2 ou 24 heures conduisent à des résultats similaires.

#### **2.2.1. Immunolocalisation de l'actine**

Les analyses immunohistochimiques montrent que la protéine d'actine est exprimée au pôle apical de certains bactériocytes, et uniquement de ce type cellulaire, chez des individus T<sub>0</sub> de *C. orbiculata* (Fig. 36). Les cellules positives à l'actine ne constituent pas la majorité des bactériocytes et semblent ne pas être cantonnées à une région particulière de la zone latérale. L'immunoréactivité à l'actine ne se retrouve pas dans tous les filaments branchiaux.



**Figure 35 : Evolution des populations symbiotiques de *Codakia orbiculata* et *Lucina pensylvanica* analysées par CARD-FISH.**

(A) Chez un individu  $T_0$  de *C. orbiculata*, la sonde eubactéries (EUBIII) permet l'hybridation des endosymbiotes qui apparaissent colorés en vert grâce au FITC. Les bactéries symbiotiques occupent la totalité du volume cytoplasmique des bactériocytes (bc). La zone ciliée (zc) n'est pas hybridée. (B) Chez un individu  $T_6$  de *C. orbiculata*, il n'y a pas de signal et les bactériocytes semblent dépourvus de symbiotes. (C) Chez un individu  $T_{6+4j}$  de *C. orbiculata*, les symbiotes sont de nouveau présents dans les bactériocytes (bc). (D) Chez un individu  $T_0$  de *L. pensylvanica*, l'hybridation des endosymbiotes avec la même sonde montre la présence de très nombreux symbiotes le long de la zone latérale des filaments branchiaux aussi bien à  $T_0$  (D) qu'à  $T_6$  (E).

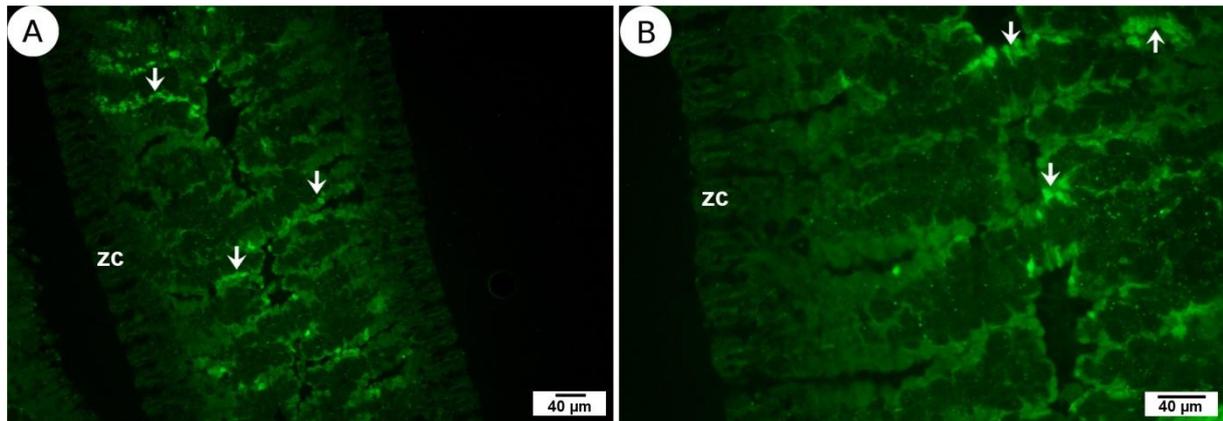


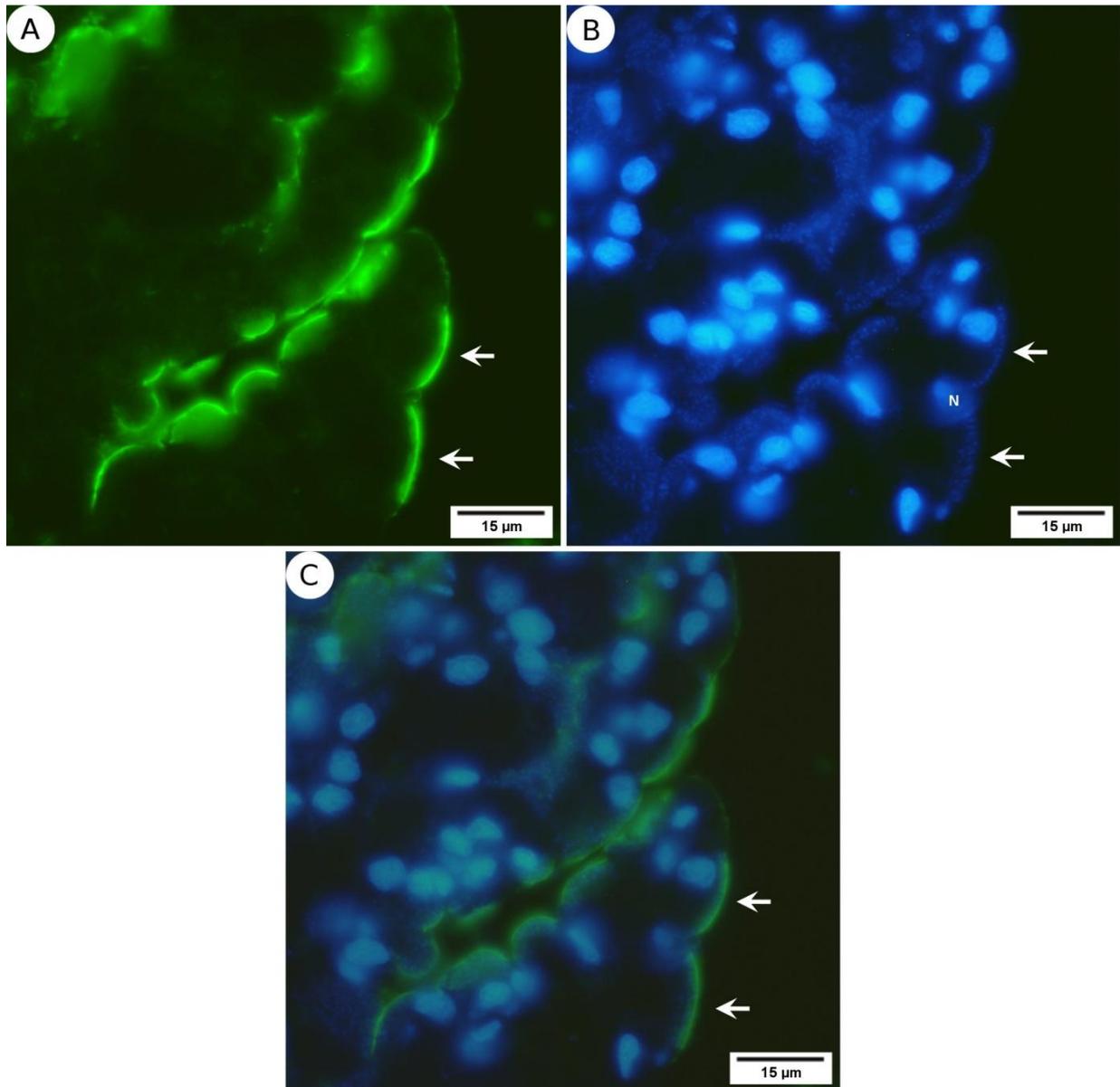
Figure 36 : Micrographies en microscopie à fluorescence de branchies de *Codakia orbiculata* témoins.

Sur un même champ d'observation : (A) Illustrations de l'immunoréactivité cellulaire à l'actine chez un individu  $T_0$  (B) Observation à plus fort grossissement de l'expression de l'actine. zc : zone ciliée ; flèche : zone d'immunoréactivité.

Chez les individus ayant jeûné 6 mois, aucune expression de l'actine n'a été détectée par immunohistochimie. Il en va de même pour les individus recolonisés 2 jours ( $T_{6+2j}$ ). En revanche, la quasi-totalité des bactériocytes présentait une immunoréactivité à l'actine chez les individus ayant jeûné 6 mois et recolonisés 8 jours ( $T_{6+8j}$ ) (Fig. 37). Le marquage occupe toute la longueur du filament dans la zone latérale, et est absent de la zone ciliée. Il est localisé au niveau du pôle apical des bactériocytes, la partie centrale du filament restant immuno-négative. Ce marquage se superpose parfaitement à la contre-coloration DAPI des symbiotes, suggérant que l'internalisation de bactéries compétentes libres dans l'environnement, mobilise le cytosquelette d'actine aux pôles apicaux des bactériocytes.

### 2.2.2. Immunolocalisation du BrdU

Les expériences préliminaires de validation du protocole BrdU ont été concluantes. Ainsi, quel que soit le délai d'incubation, 2 heures ou 5 heures, en présence d'une solution de BrdU (200  $\mu\text{g/ml}$ ), le frottis bactérien montre que les bactéries intègrent le BrdU au cours de leur division cellulaire. Comme l'illustre la figure 38, une stricte superposition entre le marquage bleu DAPI (Fig. 38A) (marquage de l'ADN bactérien d'*Escherichia coli*) et le marquage vert FITC (Fig. 38B) (marquage des molécules de BrdU) est observée, ce qui montre bien l'intégration du BrdU au sein du génome bactérien. Ce résultat est confirmé par le fait que la culture bactérienne non incubée en présence de BrdU, présente bien un marquage au DAPI (Fig. 38C), mais pas de marquage au FITC (Fig. 38D).

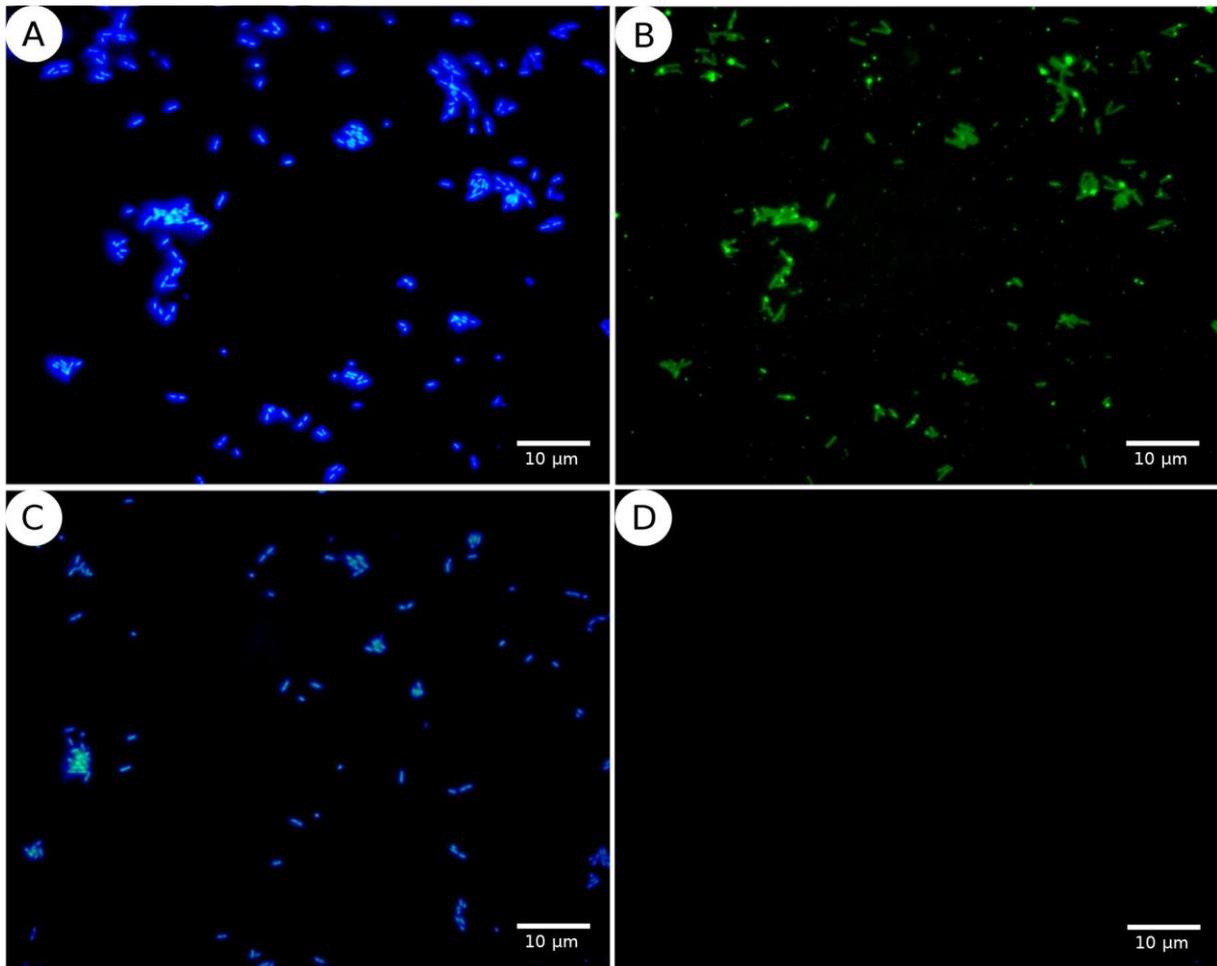


**Figure 37 : Micrographies en microscopie à fluorescence de branchies de *Codakia orbiculata* ayant jeûné 6 mois et recolonisé 8 jours.**

Sur un même champ d'observation : Illustrations (A) de l'immunoréactivité cellulaire à l'actine révélée au FITC et (B) des noyaux (N), et de l'ADN bactérien, marqués au DAPI chez un individu  $T_{6+8j}$ . (C) Superposition des marquages. flèche : zone d'intérêt montrant la colocalisation de la protéine d'actine et des bactéries symbiotiques, exclusivement situées aux pôles apicaux des bactériocytes.

La même expérience menée sur des cultures de *Citrobacter* sp. conduit à des résultats identiques.

En dépit de la nette augmentation des bactéries détectables au CARD-FISH chez les individus recolonisés ( $T_{6+2j}$ ,  $T_{6+4j}$ ,  $T_{6+8j}$ ,  $T_{6+15j}$ ), aucune immunoréactivité au BrdU de ces bactéries intracellulaires n'a été détectée comme l'illustrent les figures 25 ( $T_{5+8j}$ , chapitre 2) et 39 ( $T_{6+4j}$ ).



**Figure 38 : Micrographies en microscopie à fluorescence de frottis bactériens d'*Escherichia coli*. (gram-).**

Sur un même champ d'observation : (A) Comparaison de l'ADN bactérien révélé au DAPI et (B) de l'ADN bactérien ayant intégré le BrdU révélé au FITC d'une solution bactérienne cultivée en présence de BrdU. (C) Comparaison de l'ADN bactérien révélé au DAPI et (D) de l'ADN bactérien ayant intégré le BrdU révélé au FITC d'une solution bactérienne cultivée en l'absence de BrdU.

Toutefois, comme le montrent les résultats BrdU du Chapitre 2, le protocole BrdU fonctionne puisque certains noyaux d'échantillons déshydratés, inclus et auxquels on a retiré la résine se sont révélés positifs au BrdU.

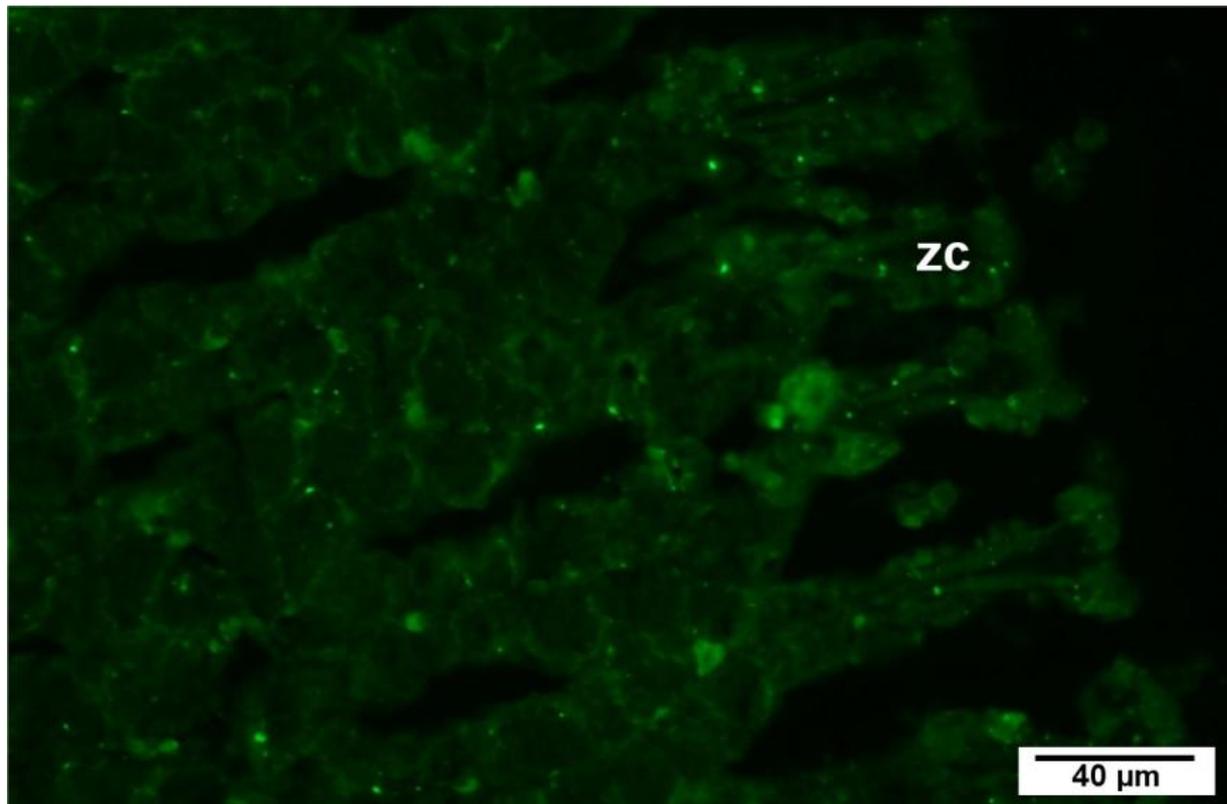


Figure 39 : Micrographie en microscopie à fluorescence de branchies de *Codakia orbiculata* ayant jeûné 6 mois puis recolonisé 4 jours puis incubé en présence de BrdU.

Illustration de l'absence d'immunoréactivité des bactéries intracellulaires au BrdU chez un individu  $T_{6+4j}$ . zc : zone ciliée. Les points verts, présents dans la zone ciliée et dans la zone latérale, ne correspondent pas à des bactéries car ils ne sont pas colorés au DAPI.

## 2.3. Suivi des populations bactériennes symbiotiques

### 2.3.1. Caractérisation du contenu en soufre élémentaire des symbiotes par la spectrométrie de fluorescence X

#### Chez *Codakia orbiculata*

Chez un individu fraîchement collecté, la concentration en soufre élémentaire, donnée par le rapport  $S_{\text{dissous}}/Cl$  est de 0,057. La courbe d'évolution de la concentration en soufre  $S_8$  en fonction du temps, montre une décroissance rapide en début de jeûne pour atteindre une valeur nulle après 1,5 mois (Fig. 40A). Cette valeur est atteinte alors que des symbiotes sont encore détectables dans la branchie. La teneur en soufre élémentaire reste nulle jusqu'à la fin des 15 mois de jeûne.

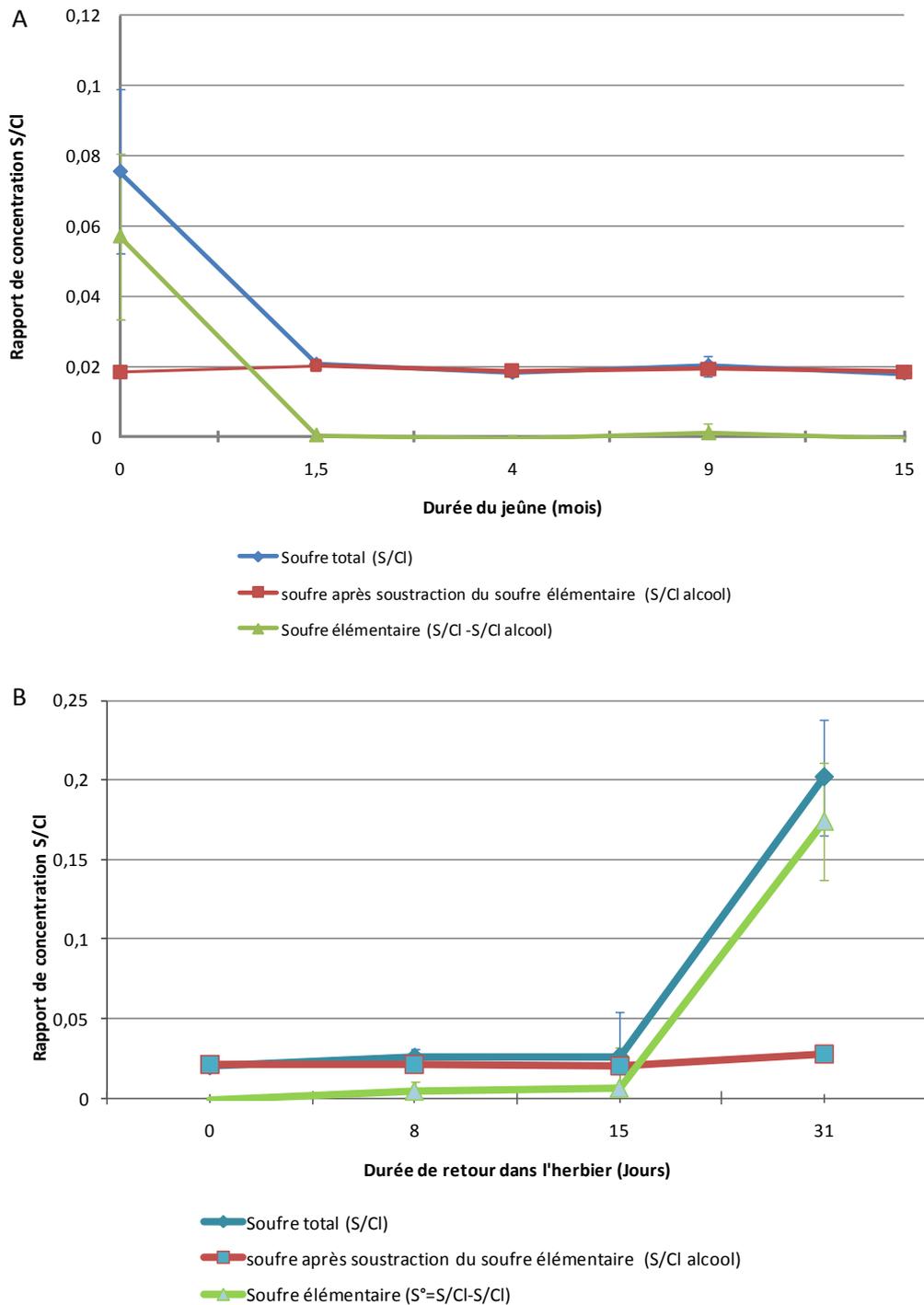


Figure 40 : Evolution du soufre chez *Codakia orbiculata*.

(A) Evolution du soufre chez *C. orbiculata* au cours du jeûne. (B) Evolution du soufre chez *C. orbiculata* au cours de la recolonisation. Les concentrations en soufre sont exprimées sous la forme d'un rapport S/Cl, le chlore de l'eau de mer étant l'étalon interne de quantification (concentration constante en chlore dans les différentes suspensions). Les courbes bleue et rouge correspondent respectivement à l'évolution de la concentration de soufre total dans les broyats bruts de branchies et après traitement des broyats à l'éthanol absolu (extraction sélective du soufre élémentaire S<sub>8</sub>) en fonction du temps de jeûne des spécimens. La courbe verte, obtenue par différence entre les deux premières courbes, correspond ainsi à l'évolution de la concentration de soufre élémentaire S<sub>8</sub> dans les spécimens en fonction de la durée du jeûne.

La courbe d'évolution de la concentration en soufre  $S_8$  en fonction du temps montre une très faible augmentation du soufre  $S_8$  entre 0 et 15 jours de retour dans l'herbier (Fig. 40B). La majeure partie du soufre élémentaire est acquise entre 15 et 31 jours de retour dans l'herbier soit après le début de la réapparition des bactéries à l'intérieur de la branchie. Sur cet intervalle, le rapport  $S_{\text{dissous}}/Cl$  pour le soufre élémentaire est pratiquement multiplié par 30. Il va de pair avec l'augmentation des bactéries détectables en CARD-FISH. Notons qu'après 31 jours de recolonisation, ce rapport dépasse largement la valeur observée chez un individu fraîchement collecté (0,057) puisqu'il est de 0,17. A ce délai le nombre de bactéries détectables en CARD-FISH semble également plus important qu'à  $T_0$  (non illustré).

### Chez *Lucina pensylvanica*

Chez un individu fraîchement collecté, la concentration en soufre élémentaire, donnée par le rapport  $S_{\text{dissous}}/Cl$  est de 0,149 soit plus de 2,5 fois la concentration observée chez *C. orbiculata*. La courbe d'évolution de la concentration en soufre  $S_8$  en fonction du temps montre également une décroissance rapide en début de jeûne. La concentration en  $S_8$  est divisée par 9,31 au bout de 3 mois de jeûne. Cette valeur reste à peu près stable jusqu'à 6 mois de jeûne. Au bout de 8 mois, elle est quasi-nulle (0,007) (Fig. 41) bien que de nombreux symbiotes restent encore détectables dans la branchie.

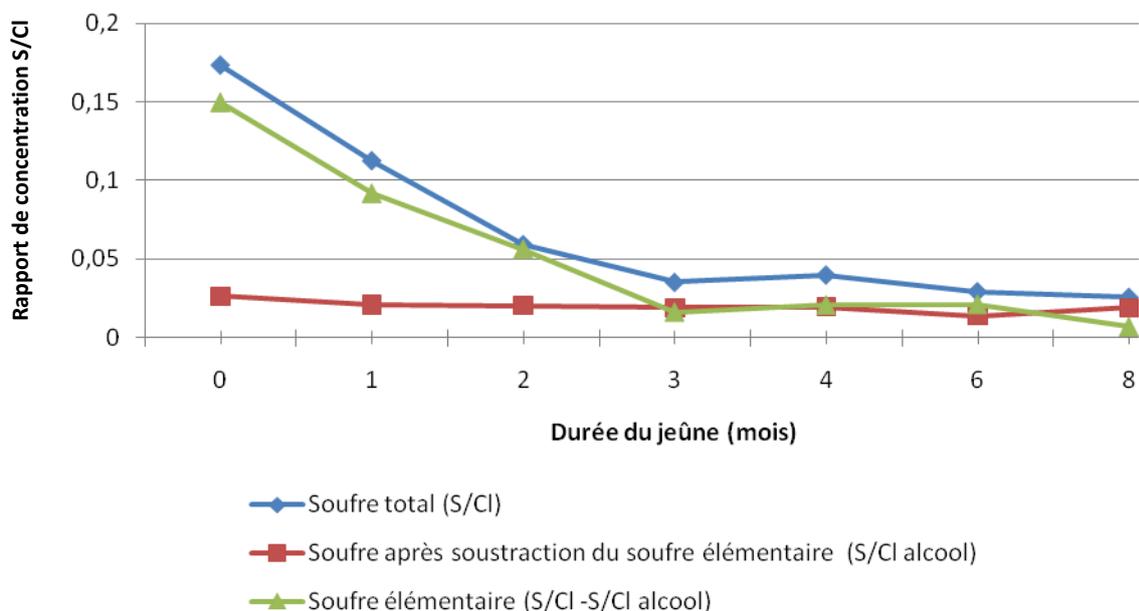


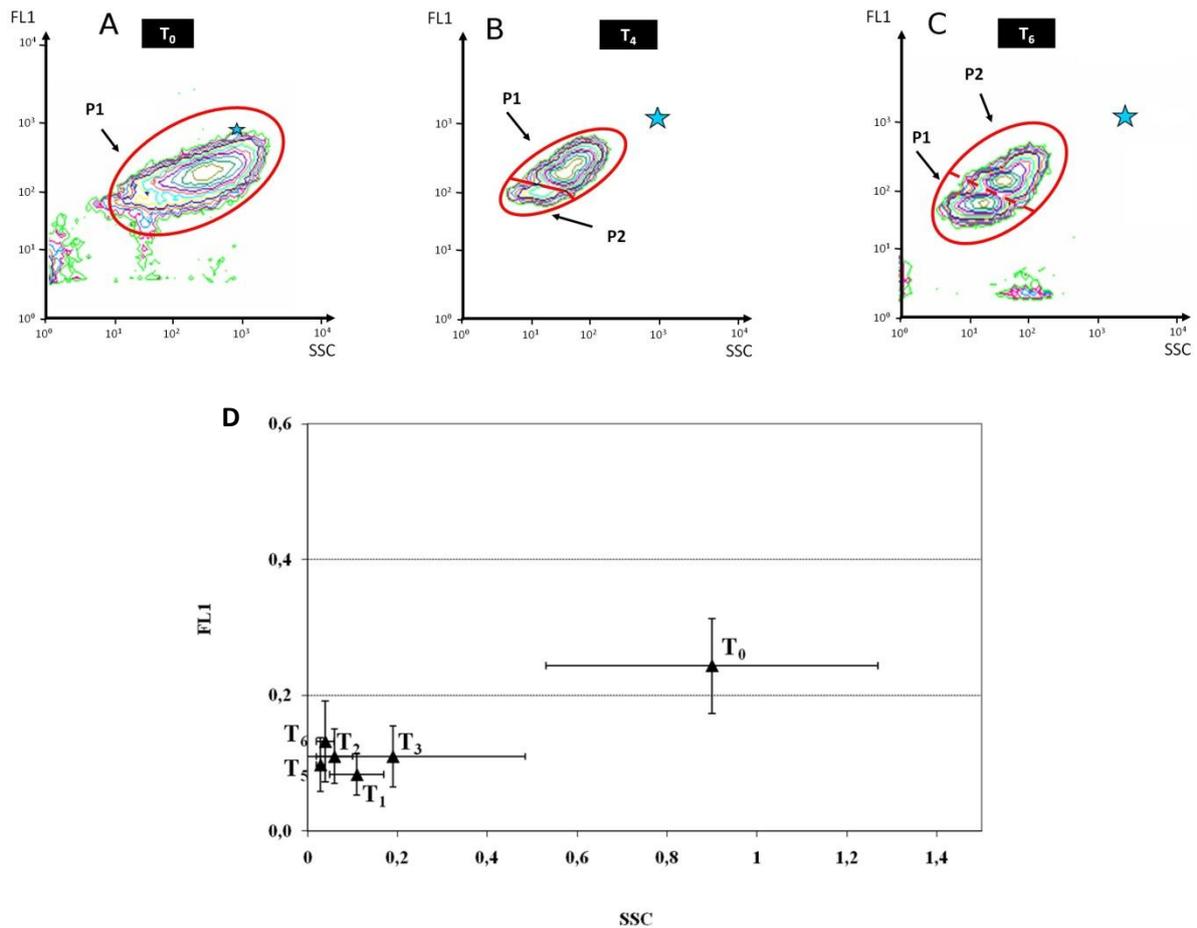
Figure 41 : Evolution du soufre chez *Lucina pensylvanica* au cours du jeûne.

Les concentrations en soufre sont exprimées sous la forme d'un rapport S/Cl, le chlore de l'eau de mer étant l'étalon interne de quantification (concentration constante en chlore dans les différentes suspensions). Les courbes bleue et rouge correspondent respectivement à l'évolution de la concentration de soufre total dans les broyats bruts de branchies et après traitement des broyats à l'éthanol absolu (extraction sélective du soufre élémentaire  $S_8$ ) en fonction du temps de jeûne des spécimens. La courbe verte, obtenue par différence entre les deux premières courbes, correspond ainsi à l'évolution de la concentration de soufre élémentaire  $S_8$  dans les spécimens en fonction du temps de jeûne.

### 2.3.2. Caractérisation du contenu génomique et de la taille des symbiotes par la cytométrie en flux

#### Chez *Codakia orbiculata*

La fraction symbiote de la branchie a été isolée puis analysée en cytométrie chez 10 individus  $T_0$  et a conduit à des résultats similaires. Chez un individu fraîchement collecté ( $T_0$ ), on distingue une unique population symbiotique, homogène, avec des niveaux de fluorescence (correspondant au contenu génomique) (FL1=0,93) et de taille relative (SSC=0,24) relativement faibles (Fig. 42A). Le paramètre SSC, qui est généralement utilisé comme « proxy » de la complexité des cellules, est un bon « proxy » de la taille des symbiotes car les granules sont constitués de soufre élémentaire dont la concentration diminue au cours du jeûne en même temps que la taille des cellules. Au cours du jeûne, l'analyse de 3 individus « réplicats » à  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_5$  et  $T_6$  a montré que la taille relative des symbiotes ainsi que leur contenu génomique diminuent rapidement. Si l'on considère que la plus petite valeur de FL1 correspond à un équivalent génome (0,06=1n), alors à  $T_0$  les symbiotes de *C. orbiculata* présentent quatre équivalents génome (4n). Entre  $T_1$  et  $T_5$  ils possèdent un équivalent génome. En effet, dès le premier mois de jeûne, le contenu génomique a été divisé par 11,6 (0,08) et la taille relative moyenne des bactéries qui constituent les populations symbiotiques, a été divisée par 8,5 (0,11). Ces valeurs restent relativement constantes jusqu'à 6 mois de jeûne (Fig. 42C) où les symbiotes possèdent deux équivalents génome. A ce stade, où les symbiotes ne sont plus détectables en CARD-FISH et ont une teneur en soufre élémentaire nulle, leur taille moyenne est divisée par 23 par rapport à  $T_0$  (0,04). On distingue alors deux sous-populations symbiotiques qui se mettent en place progressivement durant le jeûne (Fig. 42B), laissant apparaître une hétérogénéité au niveau de la population.

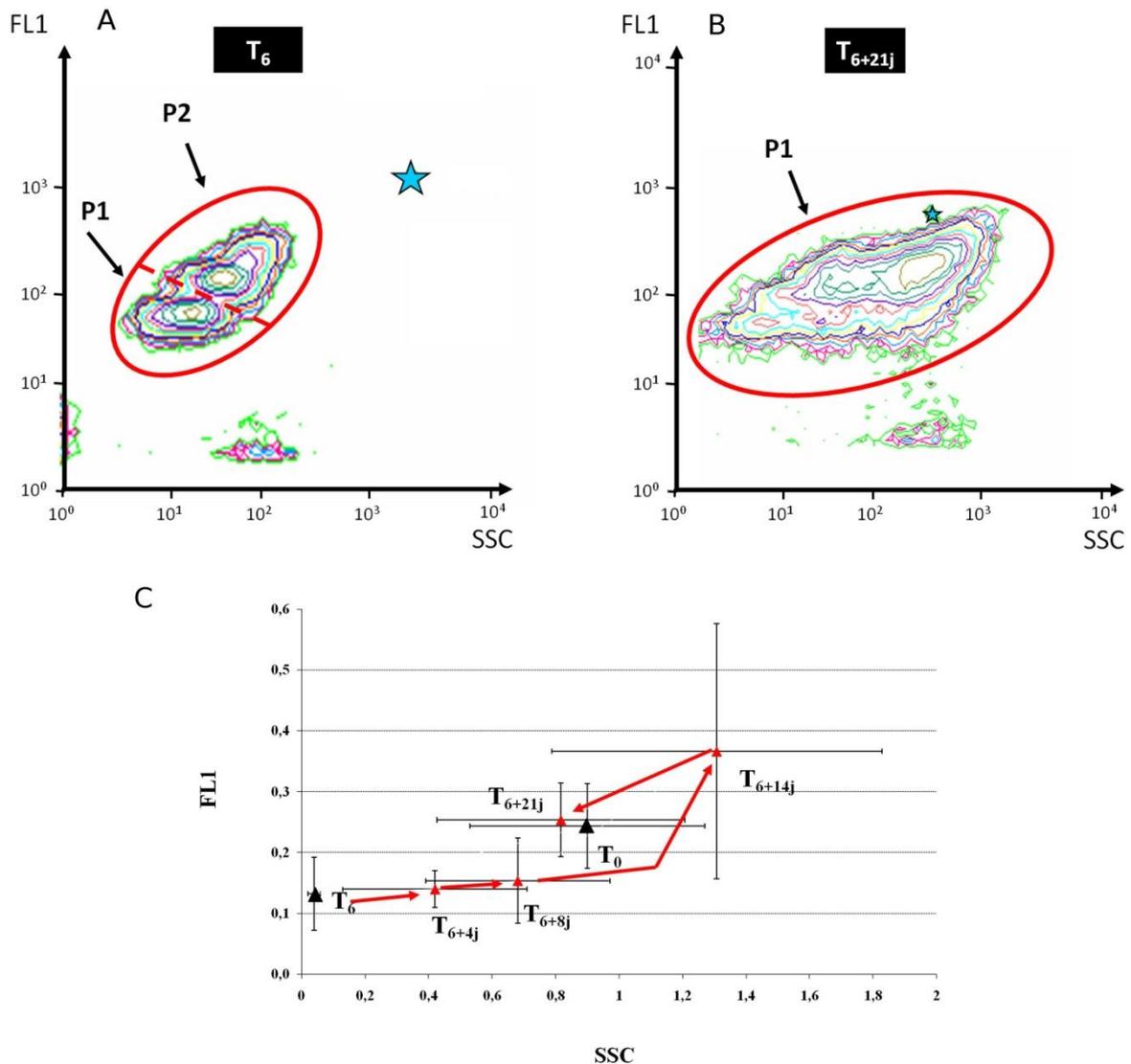


**Figure 42 :** Analyses par cytométrie en flux des populations de bactéries sulfo-oxydantes symbiotiques hébergées par *Codakia orbiculata* durant le jeûne.

Diagrammes de contour d'isodensité des populations symbiotiques (A) chez un individu à  $T_0$ , (B) chez un individu à  $T_4$  et (C) chez un individu à  $T_6$ . (D) Sur ce graphique, chaque point représente la valeur moyenne de SSC et FL1 obtenue à partir de plusieurs populations « réplicats », associées aux intervalles de confiance. Pour chaque « réplicat », la population symbiotique est caractérisée par une valeur de SSC et de FL1 (barycentres) calculée en faisant la moyenne des valeurs de SSC et de FL1 obtenues pour chaque cellule symbiotique de la population. Les valeurs données correspondent à la moyenne de 10 « réplicats » pour le  $T_0$  et 3 « réplicats » pour les autres temps. Toutes les valeurs de SSC et de FL1 présentées sur cette figure sont normalisées en fonction de billes fluorescentes de  $2 \mu\text{m}$  (étoile). P : population symbiotique.

Chez les individus replacés dans leur milieu naturel (Fig. 43), on observe dès le 4<sup>ème</sup> jour, délai auquel la réapparition des symbiotes est sans équivoque en CARD-FISH, une augmentation progressive de la taille relative des symbiotes qui est multipliée par 10,5 (0,42) par rapport à la valeur obtenue à  $T_6$  (0,04), mais qui reste environ 2 fois moins élevée que la valeur obtenue à  $T_0$  (Fig. 43C). Cette augmentation se poursuit jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour, où la taille relative moyenne des bactéries symbiotiques dépasse largement la valeur obtenue à  $T_0$  (1,32

contre 0,93). Le processus de recolonisation bactérienne se traduit par l'augmentation du contenu génomique des symbiotes. En considérant que la plus petite valeur de FL1



**Figure 43 : Analyses par cytométrie en flux des populations de bactéries sulfo-oxydantes symbiotiques hébergées par *Codakia orbiculata* durant la recolonisation.**

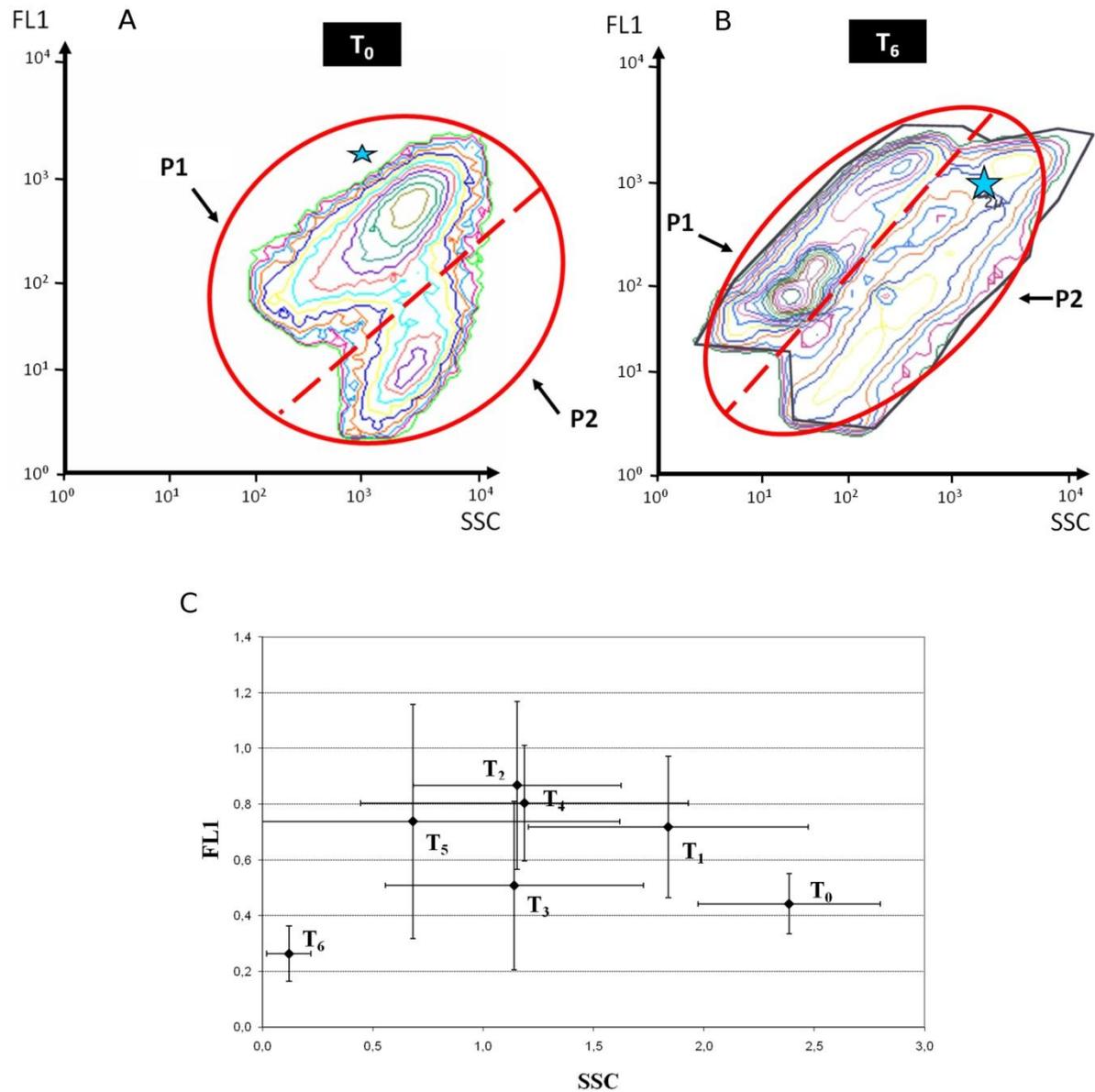
Diagrammes de contour d'isodensité des populations symbiotiques (A) chez un individu à  $T_6$  et (B) chez un individu à  $T_{6+21j}$ . (C) Sur ce graphique, chaque point représente la valeur moyenne de SSC et de FL1 obtenue à partir de plusieurs populations « réplicats », associées aux intervalles de confiance. Pour chaque « réplicat », la population symbiotique est caractérisée par une valeur de SSC et de FL1 (barycentres) calculée en faisant la moyenne des valeurs de SSC et de FL1 obtenues pour chaque cellule symbiotique de la population. Les valeurs données correspondent à la moyenne de 10 « réplicats » pour le  $T_0$  et 3 « réplicats » pour les autres temps. Toutes les valeurs de SSC et de FL1 présentées sur cette figure sont normalisées en fonction de billes fluorescentes de 2  $\mu$ m (étoile). P : population symbiotique.

correspond à un équivalent génome (1n), l'augmentation du contenu génomique des symbiotes peut être traduite en équivalent génome. On observe qu'entre  $T_6$  et  $T_{6+21j}$ , les symbiotes de *C. orbiculata* passent de deux équivalents génome (2n) à quatre équivalents

génomique ( $4n$ ). En effet, à partir du 8<sup>ème</sup> jour, et jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour, la fluorescence moyenne réémise par les symbiotes, reflétant le contenu génomique, est doublée (0,15 contre 0,37). La fluorescence atteint alors une valeur supérieure à celle observée chez les  $T_0$  (0,37 contre 0,24). Après 21 jours de recolonisation des bactériocytes par les symbiotes, les valeurs moyennes de SSC et de FL1 des symbiotes sont comparables à celles d'un  $T_0$ . Contrairement au  $T_0$ , on note une hétérogénéité pour les valeurs de SSC (Fig. 43B) au sein de la population remplacée 21 jours dans le milieu naturel, montrant que toutes les cellules de la population symbiotique ne récupèrent pas leurs tailles relatives initiales de façon synchronisée. Comme à  $T_0$  (Fig. 43A), on ne distingue plus qu'une seule population.

### Chez *Lucina pensylvanica*

Les symbiotes purifiés, obtenus à partir des 10 individus analysés chez cette espèce à  $T_0$ , (Fig. 44C), présentent des niveaux de SSC et de FL1 nettement supérieurs à ceux obtenus chez *C. orbiculata*. En effet, la taille relative moyenne des symbiotes de *L. pensylvanica* est 2,6 fois supérieure à celle des symbiotes de *C. orbiculata* et le contenu génomique (représenté par la fluorescence réémise) est 1,7 fois supérieur. Il est possible de distinguer deux sous-populations symbiotiques à  $T_0$ , montrant une hétérogénéité en termes de taille relative et contenu génomique au niveau de la population (Fig. 44A). L'analyse de 3 individus « réplicats » à  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_5$  et  $T_6$  a montré une diminution progressive de la taille des symbiotes (Figs. 44B-C) au cours du jeûne. Comparativement à la valeur obtenue à  $T_0$  (2,4), la taille moyenne des symbiotes a été divisée par 1,3 à  $T_1$ , et 2 à  $T_2$ . Cette valeur reste constante jusqu'à  $T_4$ , temps à partir duquel la taille relative moyenne recommence à chuter. A  $T_6$ , la valeur obtenue a été divisée par 8,3 par rapport à la valeur obtenue à  $T_0$ . Elle reste toutefois 2,5 fois supérieure à la valeur obtenue chez les individus  $T_6$  de *C. orbiculata*. Parallèlement à la diminution de la taille relative, le contenu génomique moyen des symbiotes augmente durant les 4 premiers mois de jeûne, passant de 0,4 à  $T_0$  à 0,7 à  $T_4$ , avant de diminuer progressivement jusqu'à  $T_6$  où il atteint 0,3, soit une valeur proche de celle obtenue à  $T_0$ . Ainsi, en considérant que la plus petite valeur de FL1 pour cette espèce correspond à un équivalent génome ( $0,2=1n$ ), le nombre d'équivalents génome va de  $2n$  à  $T_0$  à  $1n$  à  $T_6$  en passant par  $4n$  à  $T_4$ . L'hétérogénéité des populations, observée à  $T_0$ , persiste durant le jeûne puisqu'à  $T_6$  on observe deux sous-populations (Fig. 44B).



**Figure 44 : Analyses par cytométrie en flux des populations de bactéries sulfo-oxydantes symbiotiques hébergées par *Lucina pensylvanica* durant le jeûne.**

Diagrammes de contour d'isodensité des populations symbiotiques (A) chez un individu à T<sub>0</sub> et (B) chez un individu à T<sub>6</sub>. (C) Sur ce graphique, chaque point représente la valeur moyenne de SSC et FL1 obtenue à partir des plusieurs populations « réplicats », associées aux intervalles de confiance. Pour chaque « réplicat », la population symbiotique est caractérisée par une valeur de SSC et de FL1 (barycentres) calculée en faisant la moyenne des valeurs de SSC et de FL1 obtenues pour chaque cellule symbiotique de la population. Les valeurs données correspondent à la moyenne de 10 « réplicats » pour le T<sub>0</sub> et 3 « réplicats » pour les autres temps. Toutes les valeurs de SSC et de FL1 présentées sur cette figure sont normalisées en fonction de billes fluorescentes de 2 µm (étoile). P : population symbiotique.

## 3. Discussion

### 3.1. Mode d'acquisition des bactéries symbiotiques

Nous avons montré qu'à partir d'individus adultes au sein desquels plus aucun symbiote n'est détectable en CARD-FISH (individus décolonisés), il est possible de réobtenir des individus symbiotiques semblables aux  $T_0$  (individus recolonisés). Ces résultats ont été répétés sur plus de 15 lots différents d'environ 70 individus. Ils nous apportent des éléments de réflexion quant au mode d'acquisition des symbiotes.

#### 3.1.1. Hypothèses permettant d'expliquer le mode d'acquisition des bactéries symbiotiques de *C. orbiculata*

Une fois les individus  $T_6$  de *Codakia orbiculata* remis dans l'herbier, ils sont de nouveau en présence de soufre réduit et de la forme libre des symbiotes présents dans l'environnement (Gros *et al.*, 2003).

Deux hypothèses peuvent alors expliquer la détection des bactéries symbiotiques dans les bactériocytes après quelques jours dans l'herbier :

-une multiplication rapide de symbiotes résiduels non détectés au CARD-FISH après 6 mois de jeûne et qui, une fois dans les conditions environnementales optimales, se diviseraient pour remplir les bactériocytes.

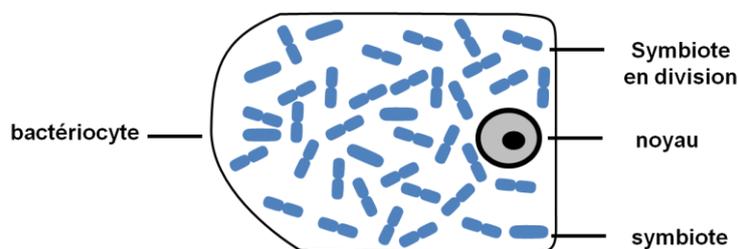


Figure 45 : Hypothèse d'une multiplication intracellulaire des symbiotes en recolonisation.

-une acquisition de bactéries environnementales compétentes. En effet, Gros *et al.* (2003), ont montré la présence de la forme libre du symbiote dans le sédiment des herbiers à *Thalassia testudinum*.

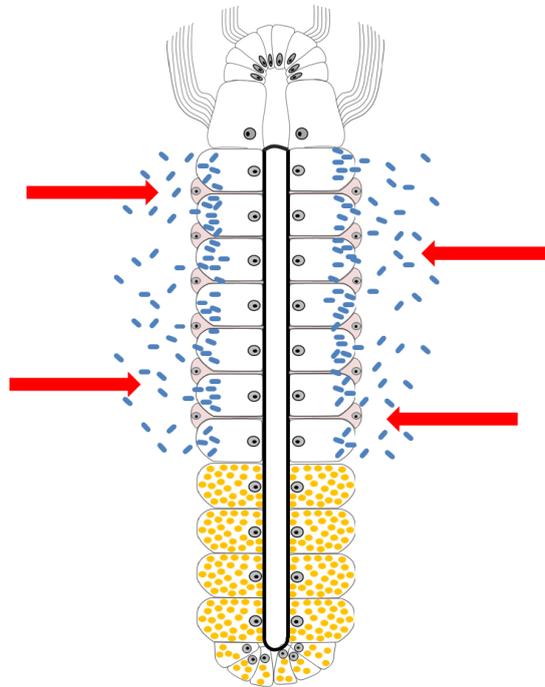


Figure 46 : Hypothèse d'une acquisition environnementale des symbiotes en recolonisation.

### 3.1.2. Eléments de réponse

Les résultats obtenus durant ce travail donnent une série d'indices qui permettront de choisir, parmi ces deux hypothèses, la plus probable.

Tout d'abord, nous avons montré qu'en privant les individus adultes de nourriture et de soufre réduit, pendant 6 mois, il était possible d'éliminer grandement les bactéries symbiotiques de la branchie et d'obtenir, ainsi, des **individus quasi-aposymbiotiques que nous avons appelé décolonisés**. Ces résultats ont été obtenus après observations au microscope des analyses CARD-FISH et de la contre-coloration au DAPI. Ils ont été répétés sur plus de 15 lots différents. Les résultats ont été répétés de manière systématique sur toutes les coupes analysées quelle que soit la partie de la branchie. Nos résultats sont confirmés par l'absence d'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S des symbiotes par PCR (Gros *et al.*, 2011). Toutefois, bien que l'analyse en cytométrie en flux ne nous ait pas permis de quantifier

précisément les symbiotes, cette technique a révélé la présence de bactéries symbiotiques à 6 mois de jeûne. Les purifications de symbiotes ayant été réalisées en eau de mer filtrée, ces bactéries peuvent provenir de l'eau de mer présente entre les filaments branchiaux, ou de symbiotes résiduels non détectés par la technique du CARD-FISH ce qui constituerait une des limites de cette technique.

Nous avons également montré qu'il y avait réapparition et **augmentation progressive des bactéries intracellulaires** chez les individus adultes décolonisés réintroduits dans l'herbier à *T. testudinum*. Là encore, ces résultats, obtenus après analyses CARD-FISH et contre-coloration au DAPI, sont confirmés par Gros *et al.* (2011), qui ont à nouveau amplifié le gène de l'ARNr 16S à partir de broyats de branchies d'individus réintroduits dans leur milieu naturel. Par ailleurs, des lots d'individus témoins ont été constitués au laboratoire à partir d'individus décolonisés, maintenus en eau de mer filtrée. L'eau de ces bacs a été supplée en sulfure et en algues. Aucun des témoins n'a présenté de symbiotes détectables à l'aide du CARD-FISH, du DAPI ou de la PCR. Ceci laisse à penser que c'est bien la disponibilité en symbiotes qui explique la réapparition des bactéries intracellulaires au sein des bactériocytes.

-Parallèlement à cela **aucune division de bactéries intracellulaires** n'a été observée chez les individus adultes recolonisés. En effet, nous n'avons pas noté d'intégration du BrdU chez les symbiotes, alors même que leur nombre augmentait dans les bactériocytes. Les témoins réalisés à partir de bactéries cultivables, nous ont pourtant montré que l'incorporation du BrdU est possible et détectable au moyen des techniques immunohistochimiques classiques chez des bactéries gram-négatives *Escherichia coli* et *Citrobacter* sp.. L'incorporation du BrdU par des bactéries a déjà été démontrée dans d'autres études, permettant ainsi la détection de bactéries du sol (Artursson & Jansson, 2003), d'une vingtaine d'espèces de bactéries marines (Pernthaler *et al.*, 2002), d'*E. coli* (Szkaradkiewicz *et al.*, 2000), de *Staphylococcus epidermis* (Rani *et al.*, 2007; Broekhuizen *et al.*, 2010). Toutefois, il est possible que les symbiotes de *C. orbiculata* ne puissent pas incorporer le BrdU car toutes les bactéries ne sont pas capables de l'assimiler même quand elles sont métaboliquement actives (Overmann, 2006). Certaines souches de bactéries, notamment de *E. coli* et de *Bacillus subtilis* ne peuvent incorporer le BrdU à moins de présenter une mutation affectant la synthèse de la thymidine (Hewitt *et al.*, 1967; Coote & Binnie, 1986). Deux études récentes, menées dans le laboratoire de Monika Bright, sur des organismes associés à des bactéries sulfo-oxydantes gram-négatives, n'ont pas montré d'incorporation du BrdU par les symbiotes (Kloiber *et al.*, 2009; Pflugfelder *et al.*, 2009). Notons que l'obtention de noyaux marqués sur des échantillons

déshydratés, fixés, inclus, prouve que le protocole BrdU que nous avons appliqué fonctionne sur coupe.

Nous avons également observé la **présence de nombreuses bactéries aux pôles apicaux de la plupart des bactériocytes** au cours des premiers jours de recolonisation. A cela, s'ajoute la **mobilisation du cytosquelette d'actine, parfaitement superposable aux marquages des bactéries apicales des bactériocytes**. L'actine est connue pour être impliquée dans les phénomènes d'endocytose (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003) et plus spécifiquement dans la phagocytose de bactéries pathogènes (Rottner *et al.*, 2005). Bien que certains pathogènes, comme *Vibrio tapetis* responsable de la maladie de l'anneau brun chez le Veneridae *Ruditapes philippinarum* (Paillard, 2004; Flye-Sainte-Marie *et al.*, 2008), pénètrent les tissus de leur hôte via des lésions de l'épithélium, d'autres sont capables de bouleverser l'organisation du cytosquelette d'actine pour favoriser leur internalisation. L'endocytose de bactéries symbiotiques se retrouve également dans le modèle végétal *Sinorhizobium–Medicago* (Jones *et al.*, 2007).

Des observations d'ouvertures dans la membrane des bactériocytes, indiquant une endocytose possible des bactéries, ont été faites chez plusieurs espèces de bivalves symbiotiques comme *Bathymodiolus azoricus* et *B. heckeræ* (Salerno *et al.*, 2005), *Maorithyas hadalis* (Fujiwara *et al.*, 2001), *B. thermophilus*, *Thyasira flexuosa*, *Lucinella divaricata* (Le Pennec *et al.*, 1988). C'est également le cas chez d'autres espèces de mollusques associés à des bactéries thioautotrophes comme les gastéropodes des sources hydrothermales *Alviniconcha hessleri* (Endow & Ohta, 1989) et *Ifremeria nautilei* (Windoffer & Giere, 1997). Toutefois, compte tenu du caractère figé de la microscopie à transmission, il est difficile d'affirmer qu'il s'agit effectivement de preuves d'endocytose et non d'exocytose.

Bien que le cytosquelette d'actine soit également mobilisé durant les processus d'exocytose (Battey *et al.*, 1999), au vu des résultats obtenus dans cette étude, il est peu probable que l'immunoréactivité à l'actine soit l'expression du processus d'exocytose. L'expulsion des symbiotes au moment même de leur réapparition dans la branchie paraît improbable. Brissac *et al.* (2009) ont d'ailleurs montré que la diminution des bactéries symbiotiques détectables en CARD-FISH durant le jeûne n'était pas en lien avec leur expulsion dans l'eau de l'environnement, puisqu'aucun symbiote n'a été détecté dans l'eau des bacs contenant des individus maintenus en jeûne. Des expériences complémentaires permettant de confirmer l'endocytose seront proposées dans le chapitre Conclusion générale et perspectives.

Il est intéressant de noter que chez *Codakia orbiculata*, seuls les bactériocytes présentent ce type de marquage ce qui confirme le lien entre la mobilisation du cytosquelette d'actine et l'apparition des symbiotes.

Notons également que le cytosquelette d'actine était également mobilisé aux pôles apicaux de quelques bactériocytes, et uniquement de ce type cellulaire, chez des individus fraîchement collectés de l'herbier. Ceci laisse à penser qu'une internalisation des bactéries est possible tout au long de la vie des individus. Bien que l'acquisition soit souvent restreinte à un stade de vie spécifique, comme le stade juvénile chez le calamar *Euprymna scolopes* (Nyholm & McFall-Ngai, 2004) ou le stade larvaire après colonisation du substrat chez certains vers tubicoles des sources hydrothermales (Nussbaumer *et al.*, 2006), certains symbiotes peuvent accéder à leur hôte durant la majeure partie de la vie de ce dernier. L'acquisition d'endosymbiotes au stade adulte a été décrite chez très peu d'organismes. Elle est connue chez les coraux associés aux algues unicellulaires *Symbiodinium* (Baker, 2001) ainsi que chez certains végétaux symbiotiques. Ainsi, la transmission des symbiotes à partir d'un stock environnemental est largement documentée chez les légumineuses associées à des bactéries fixatrices d'azote du genre *Rhizobium*, dont l'acquisition peut se faire tout au long de la croissance de la plante (Gage, 2004) et chez les végétaux associés à des cyanobactéries (Rai *et al.*, 2000).

Chez les invertébrés marins associés à des bactéries chimioautotrophes, peu d'études se sont intéressées à la transmission des symbiotes chez les adultes. Au cours d'expériences menées en laboratoire, Kádár *et al.* (2005) ont montré que les moules *Bathymodiolus azoricus* adultes, privées de sulfure pendant 30 jours accusaient une perte substantielle en symbiotes et, étaient ensuite capables d'en réacquérir une fois remises en présence de sulfure. Ces nouvelles infections seraient dues à une contamination passive à partir des bactéries libérées dans le milieu par des individus n'ayant pas perdu leurs symbiotes. En observant la diversité des symbiotes et leur répartition, Verna *et al.* (2010) ont émis l'hypothèse d'une acquisition continue des endosymbiotes hétérotrophes tout au long de la vie des vers Siboglinidae *Osedax frankpressi*, qui se nourrissent directement des os des baleines.

Notre travail vient compléter les rares études menées sur l'acquisition des endosymbiotes chez les adultes.

La transmission environnementale des symbiotes a été clairement mise en évidence chez les juvéniles de plusieurs invertébrés marins associés à des bactéries, tels les vers Siboglinidae du

genre *Osedax* (Goffredi *et al.*, 2007; Rouse *et al.*, 2009; Verna *et al.*, 2010) ou des genres *Riftia*, *Tevnia* et *Oasisia* des sources hydrothermales (Nussbaumer *et al.*, 2006).

Chez les moules du genre *Bathymodiolus*, les expériences de réinfection en laboratoire et les observations cytologiques dont nous avons fait mention plus haut (Le Pennec *et al.*, 1988; Kádár *et al.*, 2005), ainsi que des analyses génétiques (Won *et al.*, 2003; Won *et al.*, 2008), ont prouvé l'existence d'un mode de transmission horizontal. Toutefois, ce modèle symbiotique pourrait être un exemple d'organisme possédant un mode mixte de transmission des symbiotes puisque des indices de transmission verticale ont été apportés par Cary *et al.* (1993). La transmission mixte des symbiotes a été clairement démontrée chez les Vesicomidae des sources hydrothermales (Stewart *et al.*, 2008). Elle existe également chez les parasites Microsporidia comme *Amblyospora connecticus* qui infecte le moustique *Aedes cantator* avec pour hôte intermédiaire le copépode *Acanthocyclops vernalis* (Dunn & Smith, 2001).

Il existe un large faisceau d'indices, apportés par des études antérieures sur le mode d'acquisition des symbiotes chez les juvéniles des espèces du genre *Codakia* :

(i) Aucun symbiote n'a été détecté dans les gonades, les gamètes, les œufs, les embryons et les jeunes larves de bivalves (Gros *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 1997; Gros *et al.*, 1998).

(ii) Les symbiotes peuvent être acquis par des juvéniles aposymbiotiques à partir de sédiment naturel (Gros *et al.*, 1996).

(iii) La forme libre du symbiote a été détectée dans l'habitat des ces lucines (Gros *et al.*, 2003).

Notre étude vient élargir le faisceau des indices permettant de conclure à une acquisition environnementale des endosymbiotes de *C. orbiculata* et permet de généraliser ce processus à tout le cycle de vie de l'individu.

### 3.1.3. Reconstitution du scénario et choix de l'hypothèse permettant d'expliquer le mode d'acquisition des bactéries symbiotiques de *Codakia orbiculata*

D'après ces différents éléments, il semble que l'hypothèse d'une multiplication des bactéries intracellulaires (hypothèse 1) soit l'hypothèse la moins probable pour expliquer le renouvellement du stock de bactéries symbiotiques chez *C. orbiculata*. A contrario, les

résultats apportés par cette étude montrent que le renouvellement des symbiotes se ferait selon l'hypothèse 2. Ainsi, l'acquisition de nouvelles bactéries symbiotiques se ferait, chez *C. orbiculata*, par phagocytose, aux pôles apicaux des bactériocytes, de bactéries compétentes libres dans l'environnement, et ce, tout au long de la vie de l'individu.

## 3.2. Plasticité des symbiotes bactériens

Les résultats, obtenus lors des expériences de décolonisation et de recolonisation bactériennes du filament branchial, nous amènent à nous interroger sur les effets d'un jeûne prolongé et d'une réintégration dans la branchie, sur les symbiotes.

### 3.2.1. Eléments de réponse

Les analyses cytométriques, menées sur les modèles symbiotiques *C. orbiculata* et *L. pensylvanica*, ont été réalisées selon les protocoles décrits chez un autre Lucinidae, *Codakia orbicularis* à T<sub>0</sub> (Caro *et al.*, 2007) et durant un jeûne prolongé de 4 mois (Caro *et al.*, 2009). En se basant sur le fait que des études antérieures, menées sur les branchies de six espèces de Lucinidae, dont *C. orbiculata*, *C. orbicularis*, *Lucina pensylvanica*, ont mis en évidence un seul type de gène bactérien ARNr 16S amplifié par PCR (Durand & Gros, 1996b; Durand & Gros, 1996; Gros *et al.*, 2000; Gros *et al.*, 2003), Caro *et al.* (2007) ont considéré la branchie de *C. orbicularis* comme étant le lieu d'une culture bactérienne monospécifique, comparable à une culture pure. Ainsi le FL1, qui correspond à l'intensité de fluorescence des éléments marqués par le SYBR green I, peut être considéré comme reflétant le contenu génomique des symbiotes présents dans les bactériocytes, le taux d'ARN marqué par ce fluorochrome étant deux fois moins important que le taux d'ADN (Lebaron *et al.*, 1998). De ce fait, l'augmentation de la fluorescence traduit une augmentation du contenu génomique et vice-versa. Ces conclusions ont été transposées aux modèles de cette étude. L'analyse du contenu en acide nucléique des cellules individuelles, peut se faire facilement par cytométrie en flux. Cette approche a été utilisée dans plusieurs études sur des bactéries aquatiques, comme la bactérie pathogène du saumon *Yersinia ruckeri* (Thorsen *et al.*, 1992), *Alteromonas haloplanktis* (Lebaron & Joux, 1994) ou des microcosmes bactériens (Gasol *et al.*, 1999; Lebaron *et al.*, 2001).

Le second paramètre d'analyse par cytométrie en flux utilisé ici, est le SSC. Il reflète généralement la taille relative des bactéries mais, la particularité des symbiotes de

*C. orbicularis* qui possèdent des grains de soufre intracellulaires, a conduit à en faire à la fois un « proxy » de la taille et de la granulosité des cellules, ces deux paramètres étant indissociables (Caro *et al.*, 2007). Là encore, ces conclusions ont été transposées aux modèles de cette étude.

Chez les individus  $T_0$  de *C. orbiculata*, nos résultats montrent que la population bactérienne est homogène et ne peut être subdivisée en fonction du contenu génomique ou de la taille relative des cellules, alors qu'à ce même stade, chez *C. orbicularis*, il n'existe pas moins de sept sous-populations (Caro *et al.*, 2007). Chez *L. pensylvanica*, la population symbiotique se divise à  $T_0$  en deux sous-populations de taille relative importante, qui diffèrent par leur contenu génomique. En effet, la population P1 peut être considérée comme étant à fort contenu en acide nucléique, et la population P2 comme étant à faible contenu en acide nucléique.

Si l'on considère la plus petite valeur de FL1 comme étant équivalente à une copie de génome (1n), alors à  $T_0$  les symbiotes de *C. orbiculata* (4n) possèdent un génome 2 fois plus important que *L. pensylvanica* (2n). Chez *C. orbicularis*, les individus fraîchement collectés présentent six copies de génomes. D'après Caro *et al.* (2007), la présence de multiples copies de génome est caractéristique des bactéries à croissance rapide et traduit la présence de multiples fourches de réplication. Ces auteurs suggèrent que la réplication du génome symbiotique est autorisée par l'hôte mais, que la division cellulaire qui devrait en résulter, est bloquée par la sécrétion interne de molécules bactériostatiques par le bactériocyte. Il leur semble également possible que cette inhibition se fasse par le biais du *quorum sensing* (Whiteside & Munglani, 1998; Miller & Bassler, 2001; Waters & Bassler, 2005). Ce mécanisme renseigne chaque bactérie sur la densité de sa population. Une fois le quorum atteint, toutes les bactéries peuvent agir de concert pour une même fonction (virulence, bioluminescence...), en régulant l'expression de gènes cibles grâce à la sécrétion et la détection dans le milieu environnant de petites molécules "signal" auto-inductrices. Les expériences préliminaires menées à partir d'extrait des branchies de trois Lucinidae (*Codakia orbicularis*, *Lucina pensylvanica* et *Phacoides pectinatus*), montrent que les molécules auto-inductrices, impliquées dans l'inhibition de la cytotidérèse des symbiotes des Lucinidae, seraient de type homosérine lactone (Olivier Gros, communication personnelle).

Chez les Lucinidae, le contrôle des bactéries, avant leur intégration par phagocytose dans les bactériocytes de la branchie, pourrait se faire par le biais des hémocytes. Les hémocytes, qui

participent à la défense interne de l'organisme, vont phagocyter les organismes étrangers et les éliminer en sécrétant des espèces réactives de l'oxygène toxiques. Pour ce faire, ces cellules vont migrer dans le tissu et se lier à l'organisme étranger avant de le phagocyter (Lopez-Cortes, 1999). A notre connaissance, il s'agit des seules cellules de la branchie pour lesquelles un rôle phagocytaire a déjà été mis en évidence, en dehors des bactériocytes pour lesquels notre étude suggère une activité phagocytaire. La reconnaissance de l'organisme étranger entraîne une réponse moléculaire des hémocytes. Toutefois, certaines bactéries peuvent contourner le système de défense de l'organisme hôte en dérégulant les voies de signalisation impliquées dans la reconnaissance et la phagocytose. Chez la moule *Mytilus edulis* (Canesi *et al.*, 2005) et l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Travers *et al.*, 2009), la transduction du signal implique la voie de la MAP kinase p38 (p38 mitogen-activated protein kinase), protéine impliquée dans la réponse cellulaire au stress, la différenciation cellulaire, l'apoptose mais également la défense de l'organisme (Plotnikov *et al.*, 2011; Seger *et al.*, 1995). Il en va de même chez la moule symbiotique des profondeurs *Bathymodiolus azoricus* (Bettencourt *et al.* 2009). Dans le cas de l'ormeau *Haliotis tuberculata*, la réponse moléculaire des hémocytes varie en fonction de la souche de *Vibrio harveyi*. Contrairement à la souche non virulente, la souche virulente est capable d'inhiber la réponse hémocytaire en retardant la phosphorylation de la MAP kinase p38 ce qui lui permet de se multiplier rapidement au sein du sérum et d'induire une septicémie (Travers *et al.*, 2009). La recherche de voies de signalisation impliquées dans la phagocytose au niveau des hémocytes et surtout au niveau des bactériocytes, cellules dont le rôle phagocytaire était jusqu'alors inconnu chez les bivalves symbiotiques, devrait permettre de confirmer le rôle phagocytaire de ces cellules et d'identifier les acteurs moléculaires de la transduction du signal en réponse à la présence des bactéries sulfo-oxydantes.

Les analyses effectuées en cytométrie en flux lors du présent travail montrent que les bactéries présentent de plus grandes vacuoles de soufre ce qui induit une taille moyenne des symbiotes plus importante à T<sub>0</sub> chez les deux espèces étudiées que durant les mois de jeûne. De plus, les analyses en spectrométrie de fluorescence X montrent qu'à ce délai, les teneurs en soufre élémentaire sont également plus importantes qu'au cours du jeûne. L'analyse de la teneur en soufre élémentaire en fonction de taille des symbiotes, chez les T<sub>0</sub> de *C. orbicularis*, a également montré que la teneur en soufre élémentaire augmentait avec la taille relative des

symbiotes (Caro *et al.*, 2007). Ainsi, les plus grosses cellules bactériennes permettent le stockage de plus de soufre.

Chez *C. orbiculata*, les observations réalisées au MET à T<sub>0</sub> (Olivier Gros, communication personnelle), montrent que les bactériocytes présentent, à leurs pôles apicaux, de petites bactéries tandis qu'aux pôles basaux, il s'agit de grosses bactéries. Cette tendance à héberger des symbiotes de tailles différentes semble s'accroître avec le jeûne, ce qui crée progressivement deux sous-populations distinctes. Ainsi à T<sub>6</sub>, P2 comprend les symbiotes de plus grande taille et de plus fort contenu en acide nucléique, alors que P1 comprend les symbiotes de plus petite taille et de plus faible contenu en acide nucléique. Rappelons toutefois que la taille relative et le contenu génomique des symbiotes diminuent progressivement au cours du jeûne. Au cours du premier mois de jeûne, la taille des bactéries est divisée par 8 et les variations au cours des mois suivants sont bien plus faibles ce qui laisse supposer que les bactéries les plus grosses disparaissent les premières.

Chez *L. pennsylvanica*, le nombre de sous-populations ne varie pas durant le jeûne. Toutefois, comme chez *C. orbiculata*, la taille relative des symbiotes diminue durant le jeûne mais le contenu génomique présente une toute autre tendance. On observe en effet, une augmentation du contenu génomique entre T<sub>0</sub> (2n) et T<sub>4</sub> (4n), puis une diminution de ce contenu jusqu'à la dernière mesure à T<sub>6</sub> (1n). Cette courbe en cloche a également été décrite chez *C. orbicularis* dans les mêmes conditions de jeûne, avec une augmentation du contenu génomique entre T<sub>0</sub> (6n) et T<sub>1</sub> (15n), suivie d'une diminution jusqu'à la dernière mesure à T<sub>3</sub> (1n) (Caro *et al.*, 2009). Les bactéries qui possèdent un fort contenu génomique sont des bactéries particulièrement actives (Gasol *et al.*, 1999). L'augmentation du contenu génomique des bactéries pourrait être due au fait que, pendant le jeûne, les symbiotes restants cherchent à se multiplier sans toutefois pouvoir achever leur division.

Un cas similaire de contrôle eucaryote du cycle cellulaire et de la différenciation des symbiotes a été mis en évidence chez le modèle rhizobium-légume (Mergaert *et al.*, 2006). Ces auteurs ont montré que des molécules végétales, présentes dans les nodules de certaines légumineuses, provoquaient des réplifications répétées du génome des symbiotes et bloquaient la division bactérienne.

Les résultats, obtenus grâce à la spectrométrie de fluorescence X, montrent que le S<sup>0</sup> est présent au plus 1,5 mois chez *Codakia orbiculata* puisqu'à T<sub>1,5</sub> la valeur de soufre élémentaire devient nulle. Ceci confirme les résultats obtenus par Lechaire *et al.* (2008) qui

ont montré que *Codakia orbicularis* utilise le soufre élémentaire, stocké dans l'espace périplasmique des bactéries, en cas d'épuisement des sulfures dans l'environnement. D'après cette étude, les granules denses aux électrons de l'espace périplasmique sont composés de soufre élémentaire ou d'un mélange de soufre élémentaire et de sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Au bout de 6 semaines de jeûne, la composition des granules change, ils ne contiennent plus de soufre élémentaire mais uniquement des sulfates. Chez *Lucina pensylvanica*, il semble que l'utilisation du soufre élémentaire peut se prolonger un peu plus de 8 mois puisque la valeur enregistrée à  $T_8$  n'atteint pas encore zéro.

Des mesures biochimiques réalisées sur des Vesicomidae maintenus en captivité, ont permis de quantifier la perte en  $\text{S}^0$  chez deux espèces de cette famille en montrant une diminution du  $\text{S}^0$  d'environ 6 à 8 mg par jour chez *Calyptogena kilmeri* et d'environ 1 à 2 mg chez par jour *Calyptogena pacifica* (Goffredi *et al.*, 2004).

Rappelons qu'après un mois d'expérimentation en condition de jeûne, aucun rejet de symbiotes n'a pu être mis en évidence à l'aide du CARD-FISH dans l'eau des bacs contenant les Lucinidae maintenus en eau de mer filtrée (Brissac *et al.*, 2009) ce qui suggère une probable digestion enzymatique des symbiotes par l'hôte. Il est toutefois difficile de dire si ce processus résulte d'un besoin de régulation de la population symbiotique, ou si c'est le signe d'un transfert trophique du symbiote vers l'hôte. De nombreuses études se sont intéressées à la contribution des symbiotes à la relation symbiotique, en terme d'échanges trophiques, en utilisant l'autoradiographie (Felbeck, 1983; Fisher & Childress, 1986; Distel & Felbeck, 1988; Bright *et al.*, 2000) et les ratio isotopiques (Rau & Hedges, 1979; Rau, 1981a; Rau, 1981b; Brooks *et al.*, 1987; Conway *et al.*, 1989; Conway & McDowell Capuzzo, 1991; Johnson *et al.*, 1994) montrant l'existence d'un transfert à l'hôte de carbone inorganique fixé par le symbiote.

Les produits, résultant de la fixation du carbone par les symbiotes, peuvent être transférés directement à l'hôte (Prechtel *et al.*, 2004; Kneip *et al.*, 2008) ou indirectement par digestion lysosomiale des symbiotes (Fiala-Médioni & Métivier, 1986; Herry *et al.*, 1989; Fiala-Medioni *et al.*, 1990; Epstein *et al.*, 1998; Ott *et al.*, 2005). Cette activité lysosomiale a été largement décrite chez les bivalves (Le Pennec & Hily, 1984; Southward, 1986; Le Pennec *et al.*, 1988; Fiala-Medioni *et al.*, 1990; Fiala-Medioni *et al.*, 1994; Frenkiel & Moueza, 1995; Liberge *et al.*, 2001; Goffredi *et al.*, 2004; Kádár *et al.*, 2008). Le contrôle de la prolifération de pathogènes tels *Vibrios tapetis*, met également en jeu une augmentation de l'activité

lysosomiale dans les fluides extrapalléaux et dans l'hémolymphe du Veneridae *Ruditapes philippinarum* (Allam & Paillard, 1998; Allam *et al.*, 2000). Les études antérieures réalisées chez les Lucinidae, ont montré la présence de bactéries partiellement détruites associées à des structures lysosomiales chez des individus de l'espèce *C. orbicularis* fraîchement collectés (Frenkiel & Moueza, 1995). Chez un autre Lucinidae, *Phacoides pectinatus*, ces observations s'accompagnent de la détection d'enzymes lysosomiales dans la vacuole entourant certaines bactéries symbiotiques, ou au niveau d'agrégats de bactéries à un stade avancé de dégradation (Liberge *et al.*, 2001). Toutefois, aucune étude cyto-enzymatique n'a été réalisée chez des Lucinidae ayant subi un jeûne prolongé. Des pistes de travail sur ce point seront développées au chapitre Conclusion générale et perspectives.

En comparant les séquences du gène codant pour l'ARN 16s, Brissac (2009) a montré que les symbiotes de *C. orbiculata* et *L. pensylvanica* appartiennent à des clades bactériens différents. Une récente étude menée sur 17 espèces de Lucinidae a montré l'existence de trois clades chez les symbiotes des Lucinidae (Clade A, B et C) (Brissac *et al.*, 2011). Ceci pourrait expliquer les différences de comportement observées au cours du jeûne chez les deux modèles symbiotiques, notamment en matière d'évolution des contenus génomiques. Nos résultats montrent que les symbiotes de *L. pensylvanica* sont de plus grande taille. Ils peuvent ainsi stocker plus de soufre élémentaire et fournir l'énergie nécessaire à la production de dérivés carbonés plus longtemps. Ces éléments expliqueraient pourquoi après 14 mois de jeûne, les branchies de ce bivalve ne sont toujours pas purgées des symbiotes.

La décolonisation bactérienne du filament branchial de *L. pensylvanica* n'ayant été que faiblement amorcée après 14 mois de jeûne, nous n'avons pas effectué d'expérience de recolonisation chez cette espèce.

Parallèlement à l'augmentation du nombre de bactéries observées après CARD-FISH, les analyses effectuées en cytométrie en flux chez les individus *C. orbiculata* réinfectés, montrent une augmentation progressive de la taille des symbiotes qui commence à T<sub>6+4j</sub> et se poursuit jusqu'à T<sub>6+14j</sub>. Ainsi, les symbiotes semblent grossir durant les premiers jours de recrutement. L'analyse par spectrométrie en flux du soufre élémentaire présent dans la branchie montre que la proportion en S<sub>8</sub> est faible durant les 15 premiers jours de recolonisation. Elle est multipliée par 27 entre 15 et 31 jours. Ainsi, les symbiotes nouvellement acquis, stockent progressivement le soufre élémentaire dans leur espace périplasmique.

Les symbiotes nouvellement acquis seraient particulièrement actifs puisqu'ils possèdent un fort contenu génomique (Gasol *et al.*, 1999). L'augmentation du contenu génomique des bactéries traduit ici une répllication intensive du génome, sans pour autant que cela ne se traduise par une division des bactéries, bloquée probablement par la sécrétion d'une molécule bactériostatique émise par l'hôte ou par le phénomène de *quorum sensing* comme cela a été suggéré par Caro *et al.* (2007).

De manière intéressante, après 31 jours de recolonisation le signal observé après CARD-FISH est plus intense que celui observé à  $T_0$  (voir Chapitre 2). De même, les proportions de  $S_8$  observées à  $T_{6+31j}$  sont également supérieures à celles observées à  $T_0$ . Il en va de même pour la taille relative des bactéries, supérieure à  $T_{6+21j}$  à la taille relative des bactéries à  $T_0$ . La mise à disposition soudaine de nouvelles bactéries après 6 mois de jeûne semble conduire l'hôte à constituer un stock de symbiotes plus important que le stock d'un  $T_0$  pour tenter de résorber rapidement les carences accumulées. Le nouveau lot de bactéries est progressivement ramené à une taille normale puisqu'après quelques mois, aucune différence dans l'intensité des signaux n'est perceptible après CARD-FISH (observation personnelle, non illustrée).

Plusieurs techniques permettent de repérer le soufre chez des organismes symbiotiques. La microanalyse en énergie filtrée (EFTEM) a permis de détecter la présence de soufre élémentaire  $S_0$  dans l'espace périplasmique des bactéries et un mélange de soufre élémentaire et de sulfates dans le cytoplasme des bactéries symbiotiques de *C. orbicularis* (Lechaire *et al.*, 2008) ou dans de petites vésicules situées aux pôles basaux des bactériocytes de *Phacoides pectinatus* (Lechaire *et al.*, 2006). Toutefois, pour éviter le lessivage du soufre élémentaire par l'alcool, cette technique doit être couplée à de la cryofracture. Il en va de même pour l'analyse par dispersion d'énergie des rayons X (EDX) couplée à un microscope électronique à transmission. Ces techniques nécessitent une préparation longue et coûteuse. Elles requièrent également des compétences techniques avancées. La spectroscopie Raman, quant à elle, permet la détection rapide du soufre  $S_8$  chez les organismes symbiotiques car elle nécessite peu de préparation et permet l'analyse d'organismes vivants. Elle a d'ailleurs été utilisée au sein du laboratoire, pour caractériser l'ectosymbiose du nématode de mangrove *Eubostrichus diana*, ainsi que l'endosymbiose du bivalve *C. orbicularis* (Himmel *et al.*, 2009).

### 3.2.2. Reconstitution du scénario permettant d'expliquer le devenir des symbiotes chez les Lucinidae

Au cours du jeûne, les bactéries symbiotiques disparaissent progressivement en commençant par les plus grosses. On peut penser que l'hôte contrôle la densité de la population bactérienne par digestion enzymatique. En condition limitante de sulfure et de nourriture, il tend à utiliser l'avantage symbiotique jusqu'à épuisement des réserves en soufre élémentaire des bactéries, c'est-à-dire jusqu'à ce que l'oxydation du soufre ne soit plus possible et ne fournisse plus l'énergie nécessaire à la production de dérivés carbonés via le cycle de Calvin par exemple. L'avantage initialement apporté par l'association avec les endosymbiotes n'est plus, mais les besoins en carbone de l'hôte, nécessaires au maintien de son métabolisme de base, subsistent. La longévité des bactéries ayant épuisé leurs réserves en soufre élémentaire, pourrait s'expliquer par leur faculté à oxyder les molécules thiosulfates présentes naturellement dans l'eau de mer. Ce processus qui fournit moins d'énergie, ne permet sans doute que le maintien du métabolisme de la bactérie. Le *modus vivendi* de cette relation symbiotique « donnant-donnant » n'a plus lieu d'être, cet ancien partenaire bactérien devient inutile car il n'est plus nécessaire de détoxiquer le milieu en sulfures dans les conditions expérimentales de jeûne. Dans ces conditions extrêmes de survie, le symbiote continue à bénéficier d'un abri sans rien offrir en retour. Ce changement d'environnement (herbier versus bacs de jeûne), bouleverse les besoins de l'hôte et par conséquent l'équilibre relationnel hôte-symbiote. De partenaire, le symbiote passerait alors au statut de proie idéale, une source de carbone déjà intégrée qu'il ne reste plus qu'à digérer. Cette finalité est atteinte plus ou moins rapidement en fonction de la physiologie de l'espèce bactérienne, plus ou moins prompte à utiliser les sulfures stockés. La longévité des hôtes, qui va bien au-delà de celle des bactéries intracellulaires, pourrait s'expliquer par l'utilisation combinée des bactéries comme source de carbone et l'absorption par pinocytose de matière organique dissoute, présente dans l'eau des bacs de maintien. Ce dernier processus serait le seul à subsister une fois l'individu devenu totalement aposymbiotique.

Une fois les bivalves remis en présence des bactéries environnementales compétentes, ils vont intégrer ces dernières par phagocytose aux pôles apicaux des bactériocytes. Elles sont de nouveau considérées comme des partenaires avantageux, les besoins de l'hôte ayant encore une fois changé en fonction de l'environnement. L'équilibre relationnel hôte-symbiote peut à

nouveau s'établir dans une relation symbiotique « donnant-donnant ». En effet, ces bactéries qui, libres, sont de petite taille et possèdent peu de grains de soufre (Caro *et al.*, 2007), vont migrer vers le pôle basal de la cellule en augmentant progressivement leur taille et leur teneur en soufre, devenant 5 fois plus volumineuse que leurs congénères libres (Gros *et al.*, 2003).

« Vue d'un peu loin, une association mutualiste présente les deux caractères du ménage parfait, fidélité et bonne entente [...] » (Combes, 1995).

Dans les interactions durables de type mutualiste, l'association est à bénéfice réciproque. Pourtant en les regardant autrement on peut les considérer comme parasitaires.

La récompense donnée par chaque partenaire à l'autre, pour le service rendu, a un coût qui peut fluctuer en fonction de l'environnement. Le coût et les bénéfices sont souvent difficiles à évaluer et dépendent de l'angle d'étude que l'on choisit d'aborder (succès reproducteurs de l'un ou l'autre des partenaires, physiologie de l'un ou l'autre des partenaires, densités des partenaires...). Ainsi, il est possible que deux chercheurs différents considèrent une même relation comme appartenant au mutualisme ou au parasitisme. D'après Combes (1995), il existe le parasitisme vrai et le parasitisme mutualisme dans lequel le symbiote bénéficie de l'habitat-hôte mais se fait exploiter et devient source d'énergie. Ainsi, il existe dans ce que l'on pourrait considérer au départ comme des symbioses mutualistes, des cas de tricherie où l'un des partenaires exploite celui auquel il apportait auparavant un bénéfice.

La plupart des relations, liant les invertébrés marins à des bactéries symbiotiques capables de chimiosynthèse, sont considérées comme des interactions durables de type mutualiste (Cavanaugh *et al.*, 2006). C'est également le cas des Lucinidae associés à des gamma-protéobactéries sulfoxydantes. Dans cette relation, le bivalve héberge la bactérie en échange de quoi celle-ci détoxique le milieu en oxydant le soufre réduit. Du point de vue des bivalves, il existe une prévalence de 100%. Gros *et al.* (1998) ont montré que les bivalves symbiotiques avaient une croissance plus importante que les non-symbiotiques. D'autre part les symbiotes des associations chimioautotrophes ne sont pas considérés comme délétères (Stewart *et al.*, 2005).

Pourtant plusieurs éléments permettent de mettre en doute la fidélité et la bonne entente de ce « ménage ». Le test de la fidélité réalisé par Brissac *et al.* (2011) en comparant la phylogénie des symbiotes à celle des hôtes, a montré que les Lucinidae ne co-évoluent pas avec leurs

symbiotes, mais s'associent aux bactéries compétentes présentes localement, dans leur environnement. De plus, l'association n'est pas obligatoire pour le symbiote qui présente une forme libre (Gros *et al.*, 2003; Caro *et al.*, 2007). Cette forme libre va permettre l'infection des juvéniles (Gros *et al.*, 1996) et des adultes (Gros *et al.*, 2011). Une fidélité à toute épreuve des partenaires impliquerait une symbiose obligatoire avec co-évolution des partenaires et transmission verticale des symbiotes.

Cela étant, le parasite n'est peut-être pas forcément celui auquel on pense. Les *Codakia* pourraient exploiter les capacités métaboliques du symbiote sans rien fournir en échange. Cette thèse a été développée par Brissac (2009) qui suggère que la relation liant les Lucinidae aux bactéries sulfo-oxydantes serait une relation « durable avec renouvellement continu des symbiotes qui constitueraient des pseudo-organelles permettant à l'hôte hétérotrophe de devenir autotrophe ». Caro *et al.* (2007) ont également suggéré un contrôle des symbiotes par l'hôte, via des molécules bactériostatiques qui, bien que permettant la réplication du génome bactérien, empêchent la cytodivision. Toutefois, ces auteurs ont également émis l'hypothèse d'une autorégulation de la population via le *quorum sensing*. Des expériences préliminaires, menées à partir d'extrait des branchies de Lucinidae de trois espèces différentes, montrent que les molécules auto-inductrices, impliquées dans l'inhibition de la cytodivision des symbiotes des Lucinidae, seraient de type homosérine lactone (Olivier Gros, communication personnelle). Ainsi, le contrôle de la population bactérienne se ferait par les symbiotes eux-mêmes et non par l'hôte.

Mais en maintenant les individus en situation de jeûne, Brissac *et al.* (2009) ont montré qu'il n'y avait pas de rejet des symbiotes ce qui suggère une digestion enzymatique de ces derniers et donc un contrôle de la population symbiotique par l'hôte.



# **CHAPITRE 4 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



### **Des réponses... qui amènent de nouvelles questions.**

Les différentes approches utilisées durant cette étude ont permis d'appréhender l'association symbiotique Lucinidae-bactéries chimioautotrophes sous plusieurs angles : l'hôte seul, le symbiote seul et l'association des deux.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont synthétisés par la figure 47.

Ce travail nous a permis de confirmer la plasticité tissulaire et cellulaire déjà observée chez les Lucinidae du genre *Codakia* (Gros *et al.*, 1997; Caro *et al.*, 2009). En effet, nous avons montré que l'organisation du filament pouvait varier en fonction de l'environnement, en mettant en évidence une décolonisation bactérienne du filament branchial quand les individus étaient maintenus en condition de jeûne (absence de soufre réduit, de nourriture et de symbiotes libres dans l'environnement) et une recolonisation bactérienne quand ces éléments étaient de nouveau disponibles. Cette plasticité tissulaire implique principalement les bactériocytes et les cellules à grains. Ce dernier type cellulaire reste peu connu, si ce n'est qu'il a été suggéré que ces cellules étaient riches en protéines soufrées (Frenkiel & Moueza, 1995). Une caractérisation plus poussée pourrait se faire à partir d'un broyat de branchie, suivi de l'isolation de ces cellules à l'aide d'un cytomètre en flux équipé d'un trieur de cellules, avant caractérisation biochimique de la fraction pure. Nous proposons également une caractérisation plus poussée du contenu des mucocytes, la production de mucopolysaccharides sulfatés chez les Lucinidae *Lucinoma aequizonata* and *Parvilucina tenuisculpta* étant une voie de détoxification supposée (Duplessis *et al.*, 2004). Ceci pourra se faire par coloration histologique à l'azur A.

La décolonisation et la recolonisation bactériennes observées par hybridation *in situ* ont été confirmées par PCR. En effet, après 6 mois de jeûne aucune amplification de l'ADNr 16S des symbiotes n'a été obtenue à partir d'une extraction d'ADN total réalisée sur une partie de la branchie. Une fois les individus remis dans leur milieu naturel, ces gènes sont de nouveau amplifiés traduisant la réapparition des symbiotes dans la branchie. Ces résultats mériteraient d'être confirmés par des PCR quantitatives réalisées à partir d'extractions d'ADN total obtenues sur toute la branchie. La PCR quantitative qui permet de dénombrer les copies de gène, permettrait de chiffrer la perte en symbiotes et de conclure, s'il y a lieu, à l'obtention d'individus aposymbiotiques en fin de décolonisation. Cette technique doit être réalisée en

parallèle de la cytométrie en flux puisque comme nous l'avons vu en résultats, les symbiotes de Lucinidae peuvent présenter plusieurs copies de génome.

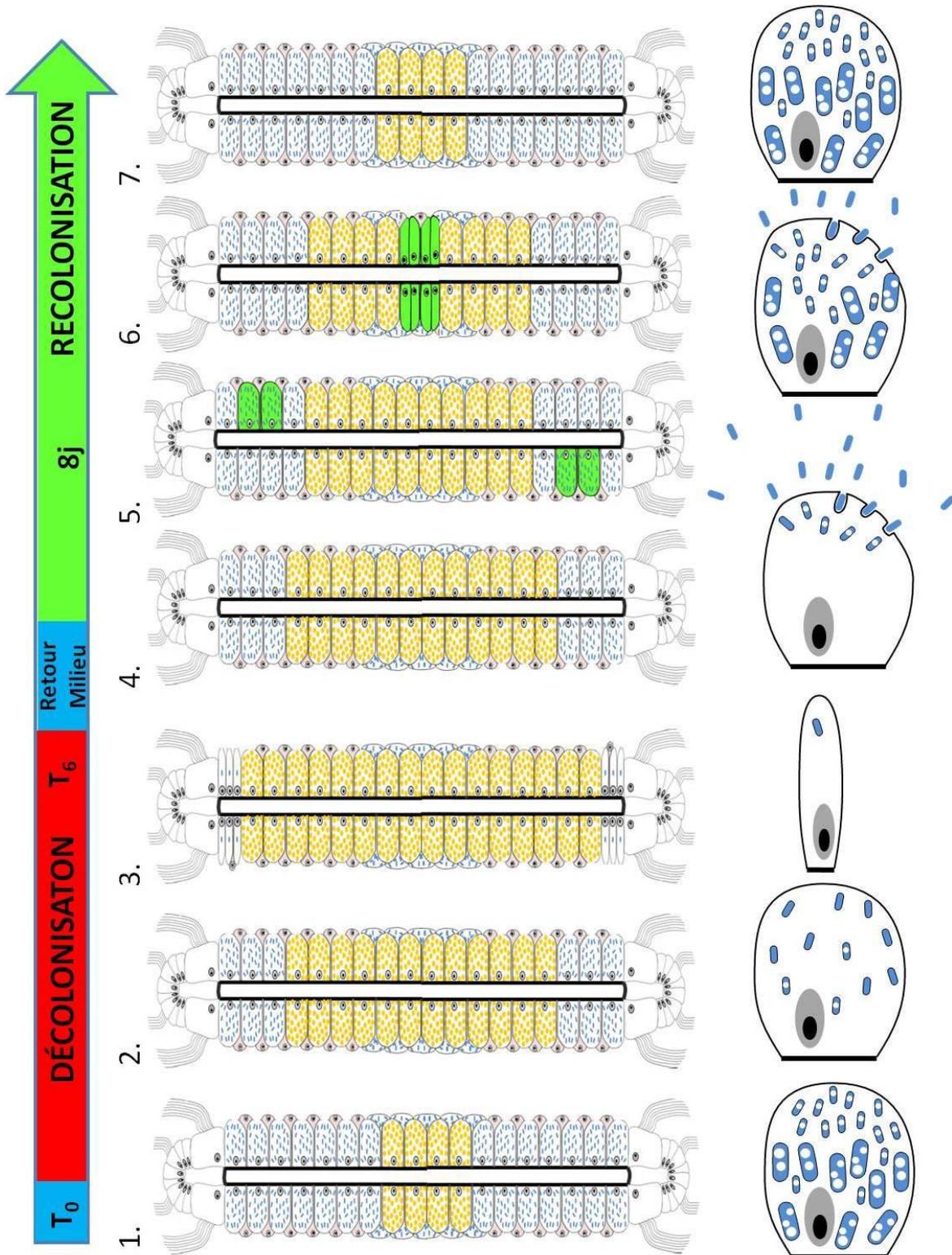


Figure 47 : Schéma de synthèse.

Schéma proposé pour récapituler l'évolution de l'association *Codakia orbiculata*-bactéries sulfo-oxydantes en fonction de la disponibilité en bactéries compétentes libres dans le milieu. Ce schéma se focalise sur l'évolution des cellules hôtes dans le tissu (partie du haut) ainsi que sur l'évolution de leur contenu (partie du bas). (1) Chez un individu fraîchement collecté de l'herbier à *Thalassia testudinum* la majeure partie du filament est occupée par des bactériocytes. Ces cellules sont nombreuses dans la zone latérale et bordent les ponts tissulaires. Elles sont remplies de bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes de tailles variables. Ces bactéries contiennent des granules de soufre élémentaire. (2,3) Au cours du jeûne, l'espace occupé par les bactériocytes diminue sans doute par apoptose d'une partie de ces cellules ainsi que par diminution du volume des cellules restantes. Le nombre de symbiotes présents dans les cellules hôte diminue donc progressivement conduisant à une décolonisation du filament branchial qui serait totale à partir de 6 mois minimum de jeûne. Au cours de la décolonisation, les réserves en soufre élémentaire contenues dans les symbiotes sont rapidement consommées. Les gros symbiotes disparaissent les premiers, conduisant à une diminution de la taille moyenne de la population symbiotique. (4) Une fois les individus remis dans le milieu naturel, l'espace occupé par les bactériocytes réaugmente. Dans un premier temps, les bactériocytes résiduels qui n'étaient plus distinguables en fin de recolonisation se remplissent de nouveaux symbiotes acquis par endocytose à partir du stock de bactéries compétentes libres de l'environnement. Les bactéries compétentes libres sont de petite taille et possèdent peu ou pas de réserves en soufre élémentaire. Une fois à l'intérieur du bactériocyte, elles vont commencer à constituer des réserves. (5,6) Une fois les bactériocytes résiduels remplis, de nouvelles cellules sont synthétisées pour permettre l'accueil d'un plus grand nombre de symbiotes. La synthèse de nouvelles cellules a lieu aux alentours de 8 jours de recolonisation. Elle se fait par multiplication de bactériocytes différenciés de la zone latérale mais également par le biais de cellules a priori indifférenciées des ponts tissulaires, qui se différencieront par la suite en bactériocytes. La taille des symbiotes augmente progressivement et la majeure partie des réserves en soufre élémentaire se fait à partir de 15 jours de recolonisation. (7) A la fin de la recolonisation, le filament branchial, les cellules hôtes et les symbiotes présentent des organisations proches de celles observées chez un individu fraîchement collecté.

En maintenant des individus de l'espèce *Codakia orbiculata* en situation de jeûne, comme cela a été réalisé dans notre étude, Brissac *et al.* (2009) ont montré qu'il n'y avait pas de rejet des symbiotes. Bien que ces résultats méritent d'être confirmés par une recherche de gènes des symbiotes dans l'eau de maintien des Lucinidae par PCR, il est fort possible que l'hôte digère les bactéries intracellulaires. La détection cytochimique d'enzymes lysosomales comme l'arylsulfatase et la phosphatase acide, devrait permettre de confirmer cette hypothèse. De telles analyses ont déjà été réalisées chez des individus fraîchement collectés des Lucinidae *Phacoides pectinatus* (Liberge *et al.*, 2001), des Mytilidae *Bathymodiolus azoricus* (Kádár *et al.*, 2008) et des Vesicomylidae *Calyptogena kilmeri* et *C. pacifica* (Goffredi *et al.*, 2004) ainsi que chez des Mytilidae *Bathymodiolus azoricus* (Kádár *et al.*, 2008) maintenus 36 heures en situation de jeûne.

En cas de jeûne, l'utilisation des trois principaux « carburants physiologiques » que sont les protéines, les lipides et les glucides, peut être simultanée ou successive. Nous avons observé une diminution des protéines totales au cours du jeûne, beaucoup plus discrète chez *L. pensylvanica* que chez *C. orbiculata*. Pour vérifier que le soudon n'utilise ses protéines que

tardivement, il serait intéressant de doser les lipides, en utilisant par exemple la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957), et les glucides, stockés sous forme de glycogène, durant la décolonisation.

Nous avons également montré que la réorganisation tissulaire associée aux phénomènes de décolonisation et de recolonisation bactériennes, combine prolifération, apoptose et sans doute variation du volume des principales cellules du filament branchial. Afin de confirmer ces variations de volume, une approximation du volume des cellules pourrait être réalisée en microscopie électronique à transmission selon la méthode proposée par Beninger *et al.* (2003) pour les mucocytes de bivalves. La mise en évidence de la mort cellulaire, focalisée sur les phénomènes apoptotiques, pourrait également être complétée par la mise en évidence de la nécrose, notamment par utilisation de l'iodure de propidium, marqueur des noyaux des cellules ayant perdues leur intégrité membranaire.

D'après nos observations, le renouvellement des cellules hôtes de la branchie peut se faire à la fois par multiplication de bactériocytes existants et par différenciation de cellules a priori indifférenciées et multipotentes, retrouvées au niveau des ponts tissulaires qui relient les deux feuillets de la branchie.

Cette hypothèse pourra être confirmée par :

-la quantification des noyaux positifs à l'aide des techniques d'imagerie offertes par les logiciels tel Image J.

-la recherche des cellules souches chez les individus fraîchement collectés.

-la caractérisation des cellules de l'hémolymphe. Nous avons en effet observé de nombreuses cellules en renouvellement dans la lacune sanguine que nous avons identifié comme étant des hémocytes. Toutefois la migration des cellules indifférenciées synthétisées dans les ponts tissulaires pourrait se faire via la lacune sanguine. La caractérisation des cellules de l'hémolymphe nous permettrait de savoir si les nouvelles cellules migrent dans le tissu via la lacune sanguine ou directement dans l'épithélium.

En comparant les résultats obtenus sur *Codakia orbiculata* à ceux obtenus sur *Lucina pensylvanica*, nous avons pu montrer que la plasticité du filament variait en fonction de l'espèce.

Nos résultats montrent également que les phénomènes de décolonisation et de recolonisation bactériennes du filament branchial s'accompagnent d'une variation de la teneur en soufre élémentaire de la branchie, ainsi que de la taille relative et du contenu génomique des symbiotes.

Nos résultats nous ont également permis de confirmer l'acquisition environnementale des symbiotes des Lucinidae (Gros *et al.*, 1997; Gros *et al.*, 1998; Gros *et al.*, 2003) déjà connue chez les juvéniles mais jamais démontrée chez les adultes, en mettant en évidence une forte mobilisation du cytosquelette d'actine aux pôles apicaux des bactériocytes, parfaitement superposable à la zone de présence des nouvelles bactéries des filaments branchiaux d'individus adultes recolonisés. L'absence de division massive des bactéries à l'intérieur des bactériocytes vient corroborer ces résultats. Pour confirmer la phagocytose des bactéries compétentes, une perspective intéressante serait la détection immunohistochimique de la clathrine, protéine qui recouvre les vésicules d'endocytose, permettant l'internalisation des particules allant des nutriments aux virus, et de la dynamine, protéine cytoplasmique associée aux clathrines. En effet, ces deux protéines peuvent être associées à l'internalisation de bactéries (Veiga & Cossart, 2005). L'utilisation de la phalloïdine, protéine capable de se lier de manière spécifique à l'actine F, couplée à une fluorochrome, utilisable du matériel fixé ou vivant, pourrait également permettre de confirmer ce résultat.

A plus long terme, nous proposons de :

-compléter l'étude de la contribution relative des bactéries symbiotiques à la nutrition de l'hôte par le suivi du transfert du carbone entre les deux partenaires.

Le carbone qui compose la matière organique produite par le partenaire autotrophe est supposé transféré à l'hôte. La confirmation du transfert de la matière organique synthétisée par le symbiote à l'hôte pourrait se faire par l'utilisation combinée d'un protocole pulse/ chase au  $^{13}\text{C}$  permettant la fixation de carbone lourd par les bactéries, suivi de l'imagerie en SIMS qui permettrait de visualiser le transfert du carbone fixé.

-compléter l'étude du dialogue moléculaire hôte-symbiote impliqué dans la reconnaissance entre les partenaires.

L'acquisition environnementale des endosymbiotes suggère l'existence de mécanismes de reconnaissance entre l'hôte et son symbiote, préalables à l'internalisation des symbiotes. L'un

des mécanismes les mieux documentés est l'interaction lectine/glycane (Kilpatrick, 2002). Chez les Lucinidae, la lectine, nommée codakine, a été mise en évidence à partir des branchies de *Codakia orbicularis* (Gourdine & Smith-Ravin, 2007) sans qu'il n'ait été possible de dire si cette lectine est sécrétée avec le mucus du bivalve comme c'est généralement le cas, ou si elle est présente à la surface d'un type cellulaire particulier comme les bactériocytes. De plus amples investigations devraient être menées dans ce sens notamment en recherchant ces lectines à partir de fractions isolées de bactériocytes, ou à partir du mucus issu des branchies. La localisation de la codakine, pourrait également être mise en évidence sur coupe par immunohistochimie. En effet, la séquence de cette protéine étant disponible, il est possible de synthétiser un anticorps dirigé contre cette protéine.

La recherche d'autres protéines impliquées dans la reconnaissance pourrait se faire par l'utilisation de la protéomique chez des individus aposymbiotiques et symbiotiques. Cette technique permettra de révéler les protéines présentes uniquement lors de la recolonisation. L'approche protéomique pourra être complétée par des banques soustractives d'ARNm.

Les résultats obtenus durant ces trois ans de thèse permettent une meilleure compréhension de la biologie de l'hôte mais aussi des symbiotes impliqués dans la relation symbiotique Lucinidae-bactéries sulfo-oxydantes. Elle permet de compléter les connaissances déjà acquises sur le mode d'acquisition des symbiotes associés aux Lucinidae tropicaux côtiers. Enfin, elle offre une meilleure compréhension des mécanismes tissulaires et cellulaires sous-jacents à la plasticité du filament branchial observée chez ces bivalves symbiotiques.





## Références

### A

---

- Abbott, R. T. (1974) American seashells: the marine Mollusca of the Atlantic and Pacific coasts of North America. Seconde édition. Van Nostrand Reinhold: New York, NY (USA). 663p.
- Ackert Jr., L. T. (2006) The role of microbes in agriculture: Sergei Vinogradskii's discovery and investigation of chemosynthesis, 1880-1910. *J Hist Biol* 39: 373-406.
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M. J., Labarta, U., & Pérez-Camacho, A. (2007) Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 146: 241-249.
- Allam, B., & Paillard, C. (1998) Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis Aquatic Org* 33: 123-128.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K. A., & Ford, S. E. (2001) Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev Comp Immunol* 25: 365-375.
- Allam, B., Paillard, C., & Auffret, M. (2000) Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J Invertebr Pathol* 76: 63-69.
- Allen, J. A. (1958) On the basic form and adaptations to habitat in the Lucinacea (Eulamellibranchia). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 241: 421-484.
- Amann, R., Fuchs, B. M., & Behrens, S. (2001) The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* 12: 231-236.
- Anderson, A. E., Childress, J. J., & Favuzzi, J. A. (1987) Net uptake of CO<sub>2</sub> driven by sulphide and thiosulphate oxidation in the bacterial symbiont-containing clam *Solemya reidi*. *J Exp Biol* 133: 1.
- Anderson, T. R., & Rice, T. (2006) Deserts on the sea floor: Edward Forbes and his azoic hypothesis for a lifeless deep ocean. *Endeavour* 30: 131-137.
- Appleby, C. A. (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu Rev Plant Biol* 35: 443-478.
- Arp, A. J., Childress, J. J., & Vetter, R. D. (1987) The sulphide-binding protein in the blood of the vestimentiferan tube-worm, *Riftia pachyptila*, is the extracellular haemoglobin. *J Exp Biol* 128: 139.
- Arp, A. J., Menon, J. G., & Julian, D. (1995) Multiple mechanisms provide tolerance to environmental sulfide in *Urechis caupo*. *Am. Zool.* 35: 132-144.
- Arp, A. J., Childress, J. J., & Fisher, C. R. (1984) Metabolic and blood gas transport characteristics of the hydrothermal vent bivalve *Calypptogena magnifica*. *Physiol Zool* 57: 648-662.
- Artursson, V., & Jansson, J. K. (2003) Use of Bromodeoxyuridine Immunocapture to Identify Active Bacteria Associated with Arbuscular Mycorrhizal Hyphae. *Appl Environ Microbiol* 69: 6208-6215.

Azevedo, C., & Cachola, R. (1992) Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. *Dis Aquat Org* 14: 69-73.

## B

---

Baco, A. R., Rowden, A. A., Levin, L. A., Smith, C. R., & Bowden, D. A. (2010) Initial characterization of cold seep faunal communities on the New Zealand Hikurangi margin. *Mar Geol* 272: 251-259.

Baker, A. C. (2001) Reef corals bleach to survive change. *Nature* 411: 765-766.

Ball, A. D., Purdy, K. J., Glover, E. A., & Taylor, J. D. (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* 75: 175-185.

Barrett, K. L., Willingham, J. M., Garvin, A. J., & Willingham, M. C. (2001) Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 49: 821-832.

Batthey, N. H., James, N. C., Greenland, A. J., & Brownlee, C. (1999) Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell* 11: 643-659.

Beninger, P. G., & Le Pennec, M. (1997) Reproductive characteristics of a primitive bivalve from a deep-sea reducing environment: Giant gametes and their significance in *Acharax alinae* (Cryptodonta: Solemyidae). *Mar Ecol Prog Ser* 157: 195-206.

Beninger, P. G., & St-Jean, S. D. (1997) The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: Unifying principles. *Mar Biol* 129: 389-397.

Beninger, P. G., Dufour, S. C., & Bourque, J. (1997) Particle processing mechanisms of the eulamellibranch bivalves *Spisula solidissima* and *Mya arenaria*. *Mar Ecol Prog Ser* 150: 157-169.

Beninger, P. G., Dufour, S. C., Decottignies, P., & Le Pennec, M. (2003) Particle processing mechanisms in the archaic, peri-hydrothermal vent bivalve *Bathypecten vulcani*, inferred from cilia and mucocyte distributions on the gill. *Mar Ecol Prog Ser* 246: 183-195.

Bettencourt, R., Dando, P., Collins, P., Costa, V., Allam, B., & Serrão Santos, R. (2009) Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 152: 278-289.

Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R.,

Jürgensen, B., Witte, U. & Pfannkuche O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation methane. *Nature* 407: 623-626.

Boettcher, K. J., Ruby, E. G., & McFall-Ngai, M. J. (1996) Bioluminescence in the symbiotic squid *Euprymna scolopes* is controlled by a daily biological rhythm. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 179: 65-73.

Borrego, J. J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M. & Ventosa A. (1996) *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int J Syst Bacteriol* 46: 480-484.

- Braby, C. E., Rouse, G. W., Johnson, S. B., Jones, W. J., & Vrijenhoek, R. C. (2007) Bathymetric and temporal variation among *Osedax* boneworms and associated megafauna on whale-falls in Monterey Bay, California. *Deep-Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 54: 1773-1791.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bright, M., & Giere, O. (2005) Microbial symbiosis in Annelida. *Symbiosis* 38: 1-45.
- Bright, M., Keckeis, H., & Fisher, C. R. (2000) An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis. *Mar Biol* 136: 621-632.
- Brissac, T. (2009) Nature, diversité et spécificité de l'association Lucinidae / bactéries sulfoxydantes. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie. 128p.
- Brissac, T., Mercot, H., & Gros, O. (2011a) Lucinidae/sulfur-oxidizing bacteria: Ancestral heritage or opportunistic association? Further insights from the Bohol Sea (the Philippines). *FEMS Microbiol Ecol* 75: 63-76.
- 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: 261-267.
- Brissac, T., Rodrigues, C. F., Gros, O., & Duperron, S. (2011b) Characterization of bacterial symbioses in *Myrtea* sp. (Bivalvia: Lucinidae) and *Thyasira* sp. (Bivalvia: Thyasiridae) from a cold seep in the Eastern Mediterranean. *Mar Ecol* 32: 198-210.
- Broekhuizen, C. A. N., Sta, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Zaat, S. A. J. (2010) Microscopic detection of viable *Staphylococcus epidermidis* in peri-implant tissue in experimental biomaterial-associated infection, identified by bromodeoxyuridine incorporation. *Infect Immun* 78: 954-962.
- Brooks, J. M., Kennicutt II, M. C., Fisher, C. R., Macko, S. A., Cole, K., Childress, J. J., Bidigare, R. et Vetter, R. (1987) Deep-sea hydrocarbon seep communities: Evidence for energy and nutritional carbon sources. *Science* 238: 1138-1142.
- Bruun, A. F. (1958) General introduction to the reports and list of deep-sea stations. *Galathea Rep* 1: 7-48.
- Butt, D., Aladaileh, S., O'Connor, W. A., & Raftos, D. A. (2007) Effect of starvation on biological factors related to immunological defence in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 264: 82-91.

## C

---

- Campbell, B. J., Jeanton, C., Kostka, J. E., Luther III, G. W., & Cary, S. C. (2001) Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the epsilon subdivision of the Proteobacteria enriched from *Alvinella pompejana* and deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* 67: 4566.
- Campbell, B. J., & Cary, S. C. (2004) Abundance of reverse tricarboxylic acid cycle genes in free-living microorganisms at deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* 70: 6282-6289.

- Campbell, B. J., Stein, J. L., & Cary, S. C. (2003) Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Appl Environ Microbiol* 69: 5070-5078.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Lorusso, L. C., Gallo, G., & Pruzzo, C. (2005) Interactions between *Mytilus* haemocytes and different strains of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Role of kinase-mediated signalling. *Cell Microbiol* 7: 667-674.
- Carballal, M. J., Villalba, A., & López, C. (1998) Seasonal Variation and Effects of Age, Food Availability, Size, Gonadal Development, and Parasitism on the Hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol* 72: 304-412.
- Caro, A., Got, P., Bouvy, M., Troussellier, M., & Gros, O. (2009) Effects of long-term starvation on a host bivalve (*Codakia orbicularis*, lucinidae) and its symbiont population. *Appl Environ Microbiol* 75: 3304-3313.
- 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.
- Cary, S. C. (1994) Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3: 121-130.
- Cary, S. C., & Giovannoni, S. J. (1993) Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5695-5699.
- Cary, S. C., Vetter, R. D., & Felbeck, H. (1989) Habitat characterization and nutritional strategies of the endosymbiont-bearing bivalve *Lucinoma aequizonata*. *Mar Ecol Prog Ser* 55: 31-45.
- Cary, S. C., Warren, W., Anderson, E., & Giovannoni, S. J. (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.
- Catul, V., Gauns, M., & Karuppasamy, P. K. (2010) A review on mesopelagic fishes belonging to family Myctophidae. *Rev Fish Biol Fish* 1-16.
- Cavanaugh, C. M. (1983) Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature* 302: 58-61.
- Cavanaugh, C. M., McKiness, Z. P., Newton, I. L. G., & Stewart, F. J. (2006) Marine chemosynthetic symbioses. *The Prokaryotes Bd 1*: 475-507.
- Cavanaugh, C. M., Gardiner, S. L., Jones, M. L., Jannasch, H. W., & Waterbury, J. B. (1981) Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: Possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213: 340-342.
- Chang, H. Y., & Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-846.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant, College Park, MD, USA, pp. 299-333.
- Cherel, Y., Robin, J-P., Heitz, A., Calgari, C., & le Maho, Y. (1992) Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol B* 162: 305-313.

- Childress, J. J., Fisher, C. R., & Brooks, J. M. (1986) A methanotrophic marine molluscan (Bivalvia, Mytilidae) symbiosis: Mussels fueled by gas. *Science* 233: 1306-1308.
- Combes, C. (1995) *Interactions durables : Écologie et évolution du parasitisme*. 524p. Masson, Paris.
- Conway, N., & McDowell Capuzzo, J. (1991) Incorporation and utilization of bacterial lipids in the *Solemya velum* symbiosis. *Mar Biol* 108: 277-291.
- Conway, N., Capuzzo, J. M., & Fry, B. (1989) The role of endosymbiotic bacteria in the nutrition of *Solemya velum*; evidence from a stable isotope analysis of endosymbionts and host. *Limnology & Oceanography* 34: 249-255.
- Coote, J., & Binnie, C. (1986) Tolerance to bromodeoxyuridine in a thymidine-requiring strain of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 132: 481.
- Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmond, J. M., Von Herzen, R. P., Ballard, Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K., Van Andel, T. (1979) Submarine thermal springs on the Galapagos rift. *Science* 203: 1073.

---

## D

---

- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S., & Higgins, J. M. G. (2005) The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev* 19: 472-488.
- Dando, P. R., Southward, A. J., Southward, E. C., Terwilliger, N. B., & Terwilliger, R. C. (1985) Sulphur-oxidising bacteria and haemoglobin in gills of the bivalve mollusc *Myrtea spinifera*.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., & Samain, J. -. (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254: 571-582.
- Deming, J. W., Reysenbach, A. L., Macko, S. A., & Smith, C. R. (1997) Evidence for the microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor: Bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. *Microsc Res Tech* 37: 162-170.
- Desbruyères, D., Chevaldonné, P., Alayse, A. M., Jollivet, D., Lallier, F. H., Jouin-Toulmond, C., Zal, F., Sarradin, P-M., Cosson, R., Caprais, J.-C., Arndt C., O'Brien J. & Guezennec J., Hourdez, S., Riso, R., Gaill, F., Laubier, L. & Toulmond, A. (1998) Biology and ecology of the "Pompeii worm" (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep-Sea Research Part II* 45: 383-422.
- Desbruyères, D., Gaill, F., Laubier, L., Prieur, D., & Rau, G. H. (1983) Unusual nutrition of the "Pompeii worm" *Alvinella pompejana* (polychaetous annelid) from a hydrothermal vent environment: SEM, TEM, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N evidence. *Mar Biol* 75: 201-205.
- D'haeseleer, M., Cocquyt, G., Cruchten, S. V., Simoens, P., & Broeck, W. V. D. (2006) Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Theriogenology* 65: 757-772.

- Distel, D. L., & Felbeck, H. (1987) Endosymbiosis in the lucinid clams *Lucinoma aequizonata*, *Lucinoma annulata* and *Lucina floridana*: a reexamination of the functional morphology of the gills as bacteria-bearing organs. *Mar Biol* 96: 79-86.
- Distel, D. L., & Felbeck, H. (1988) Pathways of inorganic carbon fixation in the endosymbiont - bearing lucinid clam *Lucinoma aequizonata*. Part 2. Analysis of the individual contributions of host and symbiont cells to inorganic carbon assimilation. *J Exp Zool* 247: 11-22.
- Distel, D. L. (2000) Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggest convergence in Mytilid body plans. *Mol Phylogenet Evol* 15: 25-33.
- Distel, D. L., & Roberts, S. J. (1997) Bacterial endosymbionts in the gills of the deep-sea wood-boring bivalves *Xylophaga atlantica* and *Xylophaga washingtona*. *Biol Bull* 192: 253-261.
- Distel, D. L., Baco, A. R., Chuang, E., Morrill, W., Cavanaugh, C., & Smith, C. R. (2000) Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? *Nature* 403: 725-726.
- Doeller, J. E., Kraus, D. W., Colacino, J. M., & Wittenberg, J. B. (1988) Gill hemoglobin may deliver sulfide to bacterial symbionts of *Solemya velum* (Bivalvia, Mollusca). *Biol Bull* 175: 388.
- Dolan, M. F., Melnitsky, H., Margulis, L., & Kolnicki, R. (2002) Motility proteins and the origin of the nucleus. *Anat Rec* 268: 290-301.
- Douglas, A. E. (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Ann Rev Entomol* 43: 17-37.
- Dubilier, N., Bergin, C., & Lott, C. (2008) Symbiotic diversity in marine animals: The art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* 6: 725-740.
- Dufour, S. C. (2005) Gill anatomy and the evolution of symbiosis in the bivalve family thyasiridae. *Biol Bull* 208: 200-212.
- Dufour, S. C., & Felbeck, H. (2006) Symbiont abundance in thyasirids (Bivalvia) is related to particulate food and sulphide availability. *Mar Ecol Prog Ser* 320: 185-194.
- Dufour, S. C., & Felbeck, H. (2003) Sulphide mining by the superextensile foot of symbiotic thyasirid bivalves. *Nature* 426: 65-67.
- Dunn, A. M., & Smith, J. E. (2001) Microsporidian life cycles and diversity: The relationship between virulence and transmission. *Microbes Infect* 3: 381-388.
- Duperron, S., Laurent, M. C. Z., Gaill, F., & Gros, O. (2008) Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of Mytilidae associated with wood falls. *FEMS Microbiol Ecol* 63: 338-349.
- Duperron, S., Lorion, J., Samadi, S., Gros, O., & Gaill, F. (2009) Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *C R Biol* 332: 298-310.
- Duperron, S., Fiala-Médioni, A., Caprais, J.-C., 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., De Beer, D., Zbinden, M., Boetius, A., Schipani, V., Kahil, N., & Gaill, F. (2009) Molecular characterization of bacteria associated with the trophosome and the tube of

- Lamellibrachia sp., a siboglinid annelid from cold seeps in the eastern Mediterranean. *FEMS Microbiol Ecol* 69: 395-409.
- Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J. -, Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Amann, R., & Dubilier, N. (2005) Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* sp. mussel from a methane seep on the Gabon Continental Margin (Southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Appl Environ Microbiol* 71: 1694-1700.
- Duplessis, M. R., Dufour, S. C., Blankenship, L. E., Felbeck, H., & Yayanos, A. A. (2004a) Anatomical and experimental evidence for particulate feeding in *Lucinoma aequizonata* and *Parvilucina tenuisculpta* (Bivalvia: Lucinidae) from the Santa Barbara Basin. *Mar Biol* 145: 551-561.
- Duplessis, M. R., Ziebis, W., Gros, O., Caro, A., Robidart, J., & Felbeck, H. (2004b) Respiration strategies utilized by the gill endosymbiont from the host lucinid *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Appl Environ Microbiol* 70: 4144-4150.
- Durand, P., & Gros, O. (1996a) Bacterial host specificity of Lucinacea endosymbionts: Interspecific variation in 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol Letters* 140: 193-198.
- Durand, P., & Gros, O. (1996b) 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.
- Durand, P., & Gros, O. (1996) Bacterial host specificity of Lucinacea endosymbionts: Interspecific variation in 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiology Letters* 140: 193-198.

## E

---

- Endow, K., & Ohta, S. (1990) Occurrence of bacteria in the primary oocytes of vesicomid clam *Calyptogena soyoae*. *Marine ecology progress series*. Oldendorf 64: 309-311.
- Endow, K., & Ohta, S. (1989) The symbiotic relationship between bacteria and a mesogastropod snail, *Alviniconcha hessleri*, collected from hydrothermal vents of the Mariana Back-Arc Basin. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology* 3: 73-82.
- Engqvist-Goldstein, Å. E. Y., & Drubin, D. G. (2003) Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 287-332.
- Epstein, S. S., Bazylinski, D. A., & Fowle, W. H. (1998) Epibiotic Bacteria on Several Ciliates from Marine Sediments. *J Eukaryot Microbiol* 45: 64-70.
- Evarts, R. P., Hu, Z., Omori, N., Omori, M., Marsden, E. R., & Thorgeirsson, S. S. (1996) Precursor-product relationship between oval cells and hepatocytes: Comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis* 17: 2143-2151.

## F

---

- Fang, Z., Feng, Q., Chi, Y., Xie, L., & Zhang, R. (2008) Investigation of cell proliferation and differentiation in the mantle of *Pinctada fucata* (Bivalve, Mollusca). *Mar Biol* 153: 745-754.
- Fausto, N. (2004) Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39: 1477-1487.
- Felbeck, H. (1983) Sulfide oxidation and carbon fixation by the gutless clam *Solemya reidi*: an animal-bacteria symbiosis. *J Comp Physiol B* 152: 3-11.
- Felbeck, H. (1981) Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213: 336-338.
- Felbeck, H., Childress, J. J., & Somero, G. N. (1981) Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* 293: 291-293.
- Fenchel, T. M., & Riedl, R. J. (1970) The sulfide system: a new biotic community underneath the oxidized layer of marine sand bottoms. *Mar Biol* 7: 255-268.
- Fiala-Medioni, A., Felbeck, H., Childress, J. J., Fisher, C. R., & Vetter, R. D. (1990) Lysosomal resorption of bacterial symbionts in deep-sea bivalves. *Endocytobiology IV*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris 335-338.
- Fiala-Medioni, A., Michalski, J. -, Jolles, J., Alonso, C., & Montreuil, J. (1994) Lysosomal and lysozyme activities in the gill of bivalves from deep hydrothermal vents. *Cr Acad Sci Ser III* 317: 239-244.
- Fiala-Médioni, A., & Métivier, C. (1986) Ultrastructure of the gill of the hydrothermal vent bivalve *Calyptogena magnifica*, with a discussion of its nutrition. *Mar Biol* 90: 215-222.
- Fisher, C. R. (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev Aquat Sci* 2: 399-436.
- Fisher, C. R., & Childress, J. J. (1986) Translocation of fixed carbon from symbiotic bacteria to host tissues in the gutless bivalve *Solemya reidi*. *Mar Biol* 93: 59-68.
- Fisher, C. R., Brooks, J. M., Vodenichar, J. S., Zande, J. M., Childress, J. J., & Burke Jnr, R. A. (1993) The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *Mar Ecol* 14: 277-289.
- Fitzgerald, J. M. (1977) Classification of luminous bacteria from the light organ of the Australian pinecone fish, *Cleidopus gloriamaris*. *Arch Microbiol* 112: 153-156.
- Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Ford, S. E., & Paillard, C. (2008) Effect of sediment grain-size on development of brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 278: 184-187.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane S., G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Frenkiel, L., & Moueza, M. (1995) Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae). *Zoomorphology* 115: 51-61.

- 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.
- Fujiwara, Y., Kato, C., Masui, N., Fujikura, K., & Kojima, S. (2001) Dual symbiosis in the cold-seep thyasirid clam *maorithyas hadalis* from the hadal zone in the japan trench, western pacific. *Mar Ecol Prog Ser* 214: 151-159.
- Fujiwara, Y., Takai, K., Uematsu, K., Tsuchida, S., Hunt, J. C., & Hashimoto, J. (2000) Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: Influence on host distributions. *Mar Ecol Prog Ser* 208: 147-155.
- Fujiwara, Y., Kawato, M., Yamamoto, T., Yamanaka, T., Sato-Okoshi, W., Noda, C., Tsuchida, S., Komai, T., Cubelio, S., Sasaki, T., Jacobsen, K., Kubokawa, K., Fujikura, K., Maruyama, T., Furushima, Y., Okoshi, K., Miyake H., Miyazaki M., Nogi Y., Yatabe, A., & Okutani T. (2007) Three-year investigations into sperm whale-fall ecosystems in Japan. *Mar Ecol* 28: 219-232.
- Fujiwara, Y., Kawato, M., Noda, C., Kinoshita, G., Yamanaka, T., Fujita, Katsuyuki, Y. & Miyazaki, J-I. (2010) Extracellular and mixotrophic symbiosis in the whale-fall mussel *Adipicola pacifica*: A trend in evolution from extra- to intracellular symbiosis. *PLoS ONE*. *In press*. doi:10.1371/journal.pone.0011808

## G

---

- Gabe, M. (1968) *Techniques histologiques*. 1113p. Masson, Paris.
- Gage, D. J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 280-300.
- Gasol, J. M., Li Zweifel, U., Peters, F., Fuhrman, J. A., & Hagström, Å. (1999) Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65: 4475-4483.
- Gavira, J. A., Camara-Artigas, A., De Jesús-Bonilla, W., López-Garriga, J., Lewis, A., Pietri, R., Yeh, S-R., Cadilla, C., & Garcia-Ruiz, J. (2008) Structure and ligand selection of hemoglobin II from *Lucina pectinata*. *J Biol Chem* 283: 9414-9423.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501.
- Glencross, B. D., & Bermudes, M. (2011) The effect of high water temperatures on the allometric scaling effects of energy and protein starvation losses in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 159: 167-174.
- Glover, E. A., Taylor, J. D., & Rowden, A. A. (2004) *Bathyaustriella thionipta*, a new lucinid bivalve from a hydrothermal vent on the Kermadec Ridge, New Zealand and its relationship to shallow-water taxa (Bivalvia: Lucinidae). *J Molluscan Stud* 70: 283-295.
- Glover, E. A., Taylor, J. D., & Williams, S. T. (2008) Mangrove associated lucinid bivalves of the central Indo-West Pacific: review of the "Austriella" group with a new genus and species (Mollusca: Bivalvia: Lucinidae). *Raffles Bulletin of Zoology, Supplement* 18: 25-40.

- Goffredi, S. K., Johnson, S. B., & Vrijenhoek, R. C. (2007) Genetic diversity and potential function of microbial symbionts associated with newly discovered species of *Osedax* polychaete worms. *Appl Environ Microbiol* 73: 2314-2323.
- Goffredi, S. K., Barry, J. P., & Buck, K. R. (2004) Vesicomylid symbioses from Monterey Bay (Central California) cold seeps. *Symbiosis* 36: 1-27.
- Gómez-Mendikute, A., Elizondo, M., Venier, P., & Cajaraville, M. P. (2005) Characterization of mussel gill cells *in vivo* and *in vitro*. *Cell Tissue Res* 321: 131-140.
- Gordon, B. R., & Leggat, W. (2010) *Symbiodinium* - Invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Mar Drugs* 8: 2546-2568.
- Gourdine, J.-P., & Smith-Ravin, E. J. (2007) Analysis of a cDNA-derived sequence of a novel mannose-binding lectin, codakine, from the tropical clam *Codakia orbicularis*. *Fish Shellfish Immunol* 22: 498-509.
- Grassé, P. P., (1960) *Traité de zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome V, fascicule III.* 1083p. Masson et Cie, Paris.
- Gratzner, H. G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475.
- Grieshaber, M. K., & Völke, S. (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu Rev Physiol* 60: 33-53.
- Gros, O. (1997) Symbiose bactérienne et transmission des symbiotes chez des Mollusques Bivalves tropicaux de la famille des Lucinidae inféodés aux herbiers et à la mangrove. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard Lyon I. 136p.
- 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. (2003) Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Mar Biol* 142: 57-66.
- 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., Duplessis, M. R., & Felbeck, H. (1999) Embryonic development and endosymbiont transmission mode in the symbiotic clam *Lucinoma aequizonata* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebr Reprod Dev* 36: 93-103.
- Gros, O., Frenkiel, L., & Mouëza, M. (1998) Gill filament differentiation and experimental colonization by symbiotic bacteria in aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebr Reprod Dev* 34: 219-231.
- Gros, O., Frenkiel, L., & Mouëza, M. (1997) Embryonic, larval, and post-larval development in the symbiotic clam *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebr Biol* 116: 86-101.
- Gros, O., Frenkiel, L., & Mouëza, M. (1996) Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in the tropical lucinid, *Linga pensylvanica* (Linné). *Symbiosis* 20: 259-280.

- 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., Elisabeth, N. H., Gustave, S. D. D., Caro, A., & Dubilier, N. (2011) Plasticity of symbiont acquisition throughout the life cycle of the shallow-water tropical lucinid *Codakia orbiculata* (Mollusca: Bivalvia). *Environ microbiol*
- Gros, O., Liberge, M., Heddi, A., Khatchadourian, C., & Felbeck, H. (2003) Detection of the Free-Living Forms of Sulfide-Oxidizing Gill Endosymbionts in the Lucinid Habitat (*Thalassia testudinum* Environment). *Appl Environ Microbiol* 69: 6264-6267.
- 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: 2324-2330.
- Gschwentner, R., Ladurner, P., Nimeth, K., & Rieger, R. (2001) Stem cells in a basal bilaterian: S-phase and mitotic cells in *Convolutriloba longifissura* (Acoela, Platyhelminthes). *Cell Tissue Res* 304: 401-408.
- Guarner, F. M. D., & Malagelada, J.-R. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512-519.

## H

---

- Hanselmann, R., Smolowitz, R., & Gibson, D. (2000) Identification of proliferating cells in hard clams. *Biol Bull* 199: 199-200.
- Harada, M., Yoshida, T., Kuwahara, H., Shimamura, S., Takaki, Y., Kato, C., Miwa, T., Miyake, H., & Maruyama, T. (2009) Expression of genes for sulfur oxidation in the intracellular chemoautotrophic symbiont of the deep-sea bivalve *Calymptogena okutanii*. *Extremophiles* 13: 895-903.
- Harmer, T. L., Rotjan, R. D., Nussbaumer, A. D., Bright, M., Ng, A. W., DeChaine, E. G., & Cavanaugh, C. M. (2008) Free-living tube worm endosymbionts found at deep-sea vents. *Appl Environ Microbiol* 74: 3895-3898.
- Hégaret, H., Wikfors, G. H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J. H., Smith, B., Dixon, M.S. Quere, C. Le Coz, J.R., Paillard, C., Moal, J., Samain, J.-F. (2004) Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* 234: 541-560.
- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. & David Allis, C. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106: 348-360.
- Hentschel, U., & Felbeck, H. (1995) Nitrate respiration in chemoautotrophic symbionts of the bivalve *Lucinoma aequizonata* is not regulated by oxygen. *Appl Environ Microbiol* 61: 1630-1633.
- Hentschel, U., Cary, S. C., & Felbeck, H. (1993) Nitrate respiration in chemoautotrophic symbionts of the bivalve *Lucinoma aequizonata*. *Mar Ecol Prog Ser* 94: 35-41.

- Herry, A., Diouris, M., & Le Pennec, M. (1989) Chemoautotrophic symbionts and translocation of fixed carbon from bacteria to host tissues in the littoral bivalve *Loripes lucinalis* (Lucinidae). *Mar Biol* 101: 305-312.
- Hervant, F., & Renault, D. (2002) Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: A proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *J Exp Biol* 205: 2079-2087.
- Hewitt, R., Suit, J. C., & Billen, D. (1967) Utilization of 5-bromouracil by thymineless bacteria. *J Bacteriol* 93: 86-89.
- Himmel, D., Maurin, L. C., Gros, O., & Mansot, J. L. (2009) Raman microspectrometry sulfur detection and characterization in the marine ectosymbiotic nematode *Eubostrichus diana* (Desmodoridae, Stilbonematidae). *Biol Cell* 101: 43-54.
- Hine, P. M. (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 9: 367-385.
- Hirose, E., & Hirose, M. (2007) Morphological process of vertical transmission of photosymbionts in the colonial ascidian *Trididemnum miniatum* Kott, 1977. *Mar Biol* 150: 359-367.
- Hirsch, A. M., Lum, M. R., & Downie, J. A. (2001) What makes the Rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol* 127: 1484-1492.
- Hoffmeister, M., & Martin, W. (2003) Interspecific evolution: Microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environ Microbiol* 5: 641-649.
- Hughes, D. J., & Crawford, M. (2008) A new record of the vestimentiferan *Lamellibrachia* sp. (Polychaeta: Siboglinidae) from a deep shipwreck in the eastern Mediterranean. *Marine Biodiversity Records* 1: publié en ligne uniquement.
- Hügler, M., Petersen, J. M., Dubilier, N., Imhoff, J. F., & Sievert, S. M. (2011) Pathways of carbon and energy metabolism of the epibiotic community associated with the deep-sea hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *PLoS ONE* 6: *in press*. DOI: 10.1371/journal.pone.0016018
- Hurtado, L. A., Mateos, M., Lutz, R. A., & Vrijenhoek, R. C. (2003) Coupling of bacterial endosymbiont and host mitochondrial genomes in the hydrothermal vent clam *Calyptogena magnifica*. *Appl Environ Microbiol* 69: 2058-2064.
- Hwang, D. F., Arakawa, O., Saito, T., Noguchi, T., Simidu, U., Tsukamoto, K. (1989) Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus *Octopus maculosus*. *Mar Biol* 100: 327-332.

## J

---

- Jannasch, H. W. (1989) Sulphur emission and transformations at deep sea hydrothermal vents. Evolution of the global biogeochemical sulphur cycle. *Scope* 7:181-190.
- Jannasch, H. W., & Taylor, C. D. (1984) Deep-sea microbiology. *Annu Rev Microbiol* 38: 487-514.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000) Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191: 45-52.
- Johnson, M., Diouris, M., & Le Pennec, M. (1994) Endosymbiotic bacterial contribution in the carbon nutrition of *Loripes lucinalis* (Mollusca: Bivalvia). *Symbiosis* 17: 1-13.

- Jones, B. W., & Nishiguchi, M. K. (2004) Counterillumination in the Hawaiian bobtail squid, *Euprymna scolopes* Berry (Mollusca: Cephalopoda). *Mar Biol* 144: 1151-1155.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium* - *Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 5: 619-633.
- Joyner, J. L., Peyer, S. M., & Lee, R. W. (2003) Possible Roles of Sulfur-Containing Amino Acids in a Chemoautotrophic Bacterium-Mollusc Symbiosis. *Biol Bull* 205: 331-338.

---

## K

---

- Kádár, E., Davis, S. A., & Lobo-Da-Cunha, A. (2008) Cytoenzymatic investigation of intracellular digestion in the symbiont-bearing hydrothermal bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *Mar Biol* 153: 995-1004.
- Kádár, E., Bettencourt, R., Costa, V., Santos, R. S., Lobo-da-Cunha, A., & Dando, P. (2005) Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 318: 99-110.
- Kaltenpoth, M., Winter, S. A., & Kleinhammer, A. (2009) Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrochocid bugs. *FEMS Microbiol Ecol* 69: 373-383.
- Kane, E. A., Olson, P. A., Gerrodette, T., & Fiedler, P. C. (2008) Prevalence of the commensal barnacle *Xenobalanus globicipitis* on cetacean species in the eastern tropical Pacific Ocean, and a review of global occurrence. *Fish Bull* 106: 395-404.
- Kanzler, S., & Galle, P. R. (2000) Apoptosis and the liver. *Semin Cancer Biol* 10: 173-184.
- Kapuscinski, J. (1995) DAPI: a DMA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech Histochem* 70: 220-233.
- Kilpatrick, D. C. (2002) Animal lectins: A historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1572: 187-197.
- Kloiber, U., Pflugfelder, B., Rinke, C., & Bright, M. (2009) Cell proliferation and growth in *Zoothamnium niveum* (oligohymenophora, peritrichida) - Thiotrophic bacteria symbiosis. *Symbiosis* 47: 43-50.
- Kneip, C., Voß, C., Lockhart, P. J., & Maier, U. G. (2008) The cyanobacterial endosymbiont of the unicellular algae *Rhopalodia gibba* shows reductive genome evolution. *BMC Evol Biol* 8: article n°30.
- Knudsen, J. (1961) The bathyal and abyssal *Xylophaga* (Pholadidae, Bivalvia). *Galathea Rep* 5: 163-209.
- Kraus, D. W., & Wittenberg, J. B. (1990) Hemoglobins of the *Lucina pectinata*/bacteria symbiosis. I. Molecular properties kinetics and equilibria of reactions with ligands. *J Biol Chem* 265: 16043-16053.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Peter, M.E., Tschoop, J., Yuan, J., Piacentini M., Zhivotovsky B. & Melino, G. (2009) Classification of

cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16: 3-11.

Krueger, D. M., Gustafson, R. G., & Cavanaugh, C. M. (1996) Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *Biol Bull* 190: 195-202.

Krylova, E. M., & Sahling, H. (2010) Vesicomylidae (Bivalvia): Current taxonomy and distribution. *PLoS ONE* 5: article n° e9957.

---

## L

---

Ladurner, P., Rieger, R., & Bagnà, J. (2000) Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *Macrostomum* sp.: A bromodeoxyuridine analysis. *Dev Biol* 226: 231-241.

Lane, J. M. (1986) Allometric and biochemical studies on starved and unstarved clams, *Rangia cuneata* (Sowerby, 1831). *J Exp Mar Biol Ecol* 95: 131-143.

Laurent, M. C. Z. (2009) Les écosystèmes bois coulés en mangrove : Dynamique de colonisation et symbioses bactériennes liées à la production de sulfures. Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane. 177p.

Laycock, M. V., Hiram, T., Hasnain, S., Watson, D., & Storer, A. C. (1989) Purification and characterization of a digestive cysteine proteinase from the American lobster (*Homarus americanus*). *Biochem J* 263: 439-444.

Le Pennec, M., & Hily, A. (1984) Anatomie, structure et ultrastructure de la branchie d'un Mytilidae des sites hydrothermaux du Pacifique oriental. *Oceanol Acta* 7: 517-523.

Le Pennec, M., Diouris, M., & Herry, A. (1988) Endocytosis and lysis of bacteria in gill epithelium of *Bathymodiolus thermophilus*, *Thyasira flexuosa* and *Lucinella divaricata* (Bivalve, Molluscs). *J Shellfish Res* 7: 483-489.

Lebaron, P., & Joux, F. (1994) Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. *Appl Environ Microbiol* 60: 4345-4350.

Lebaron, P., Parthuisot, N., & Catala, P. (1998) Comparison of blue nuclei acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Appl Environ Microbiol* 64: 1725-1730.

Lebaron, P., Servais, P., Agogue, H., Courties, C., & Joux, F. (2001) Does the High Nucleic Acid Content of Individual Bacterial Cells Allow Us to Discriminate between Active Cells and Inactive Cells in Aquatic Systems? *Appl Environ Microbiol* 67: 1775-1782.

Lebata, M. J. H. L. (2001) Oxygen, sulphide and nutrient uptake of the mangrove mud clam *Anodontia edentula* (Family: Lucinidae). *Mar Pollut Bull* 42: 1133-1138.

- Lechaire, J.-P., Frébourg, G., Gaill, F., & Gros, O. (2008) *In situ* characterization of sulphur in gill-endosymbionts of the shallow water lucinid *Codakia orbicularis* (Linné, 1758) by high-pressure cryofixation and EFTEM microanalysis. *Mar Biol* 154: 693-700.
- Lechaire, J.-P., Frébourg, G., Gaill, F., & Gros, O. (2006) *In situ* localization of sulphur in the thioautotrophic symbiotic model *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) by cryo-EFTEM microanalysis. *Biol Cell* 98: 163-170.
- Lee, P. N., McFall-Ngai, M. J., Callaerts, P., & de Couet, H. G. (2009) The hawaiian bobtail squid (*Euprymna scolopes*): A model to study the molecular basis of eukaryote-prokaryote mutualism and the development and evolution of morphological novelties in cephalodes. *Cold Spring Harbor Protoc* 4.
- Leif, R. C., Stein, J. H., & Zucker, R. M. (2004) A Short History of the Initial Application of Anti-5-BrdU to the Detection and Measurement of S Phase. *Cytometry Part A* 58: 45-52.
- 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.
- Lonsdale, P. (1977) Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep-Sea Res* 24: 857-858.
- Lopez-Cortes, L., Castro, D., Navas, J. I., & Borrego, J. J. (1999) Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Fish Shellfish Immunol* 9: 543-555.
- López-García, P., Gaill, F., & Moreira, D. (2002) Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachytila*. *Environ Microbiol* 4: 204-215.
- Lorion, J., Buge, B., Cruaud, C., & Samadi, S. (2010) New insights into diversity and evolution of deep-sea Mytilidae (Mollusca: Bivalvia). *Mol Phylogenet Evol* 57: 71-83.
- Lorion, J., Duperron, S., Gros, O., Cruaud, C., & Samadi, S. (2009) Several deep-sea mussels and their associated symbionts are able to live both on wood and on whale falls. *Proc R Soc B Biol Sci* 276: 177-185.
- Luciński, R., Polcyn, W., & Ratajczak, L. (2002) Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* - Legumes. *Acta Biochim Pol* 49: 537-546.

## M

---

- Margulis, L. (1993) *Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the Archean and Proterozoic eons*. 452p. Freeman et Cie, New York.
- Margulis, L. (2004) Serial endosymbiotic theory (SET) and composite individuality. *Microbiology Today* 31: 172-175.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., & Vaulot, D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* 63: 186-193.

- Martinez Exposito, M. J., Pasantes, J. J., & Mendez, J. (1994) Proliferation kinetics of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) gill cells. *Mar Biol* 120: 41-46.
- Matozzo, V., Marin, M. G., Cima, F., & Ballarin, L. (2008) First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Cell Biol Int* 32: 865-868.
- Maurin, L. (2009) Ecologie des nématodes marins libres et symbiotiques en milieu tropical. Développement de la microspectrométrie Raman comme outil de caractérisation des organismes thiotrophiques. Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane. 151p.
- Maurin, L. C., Himmel, D., Mansot, J. L., & Gros, O. (2010) Raman microspectrometry as a powerful tool for a quick screening of thiotrophy: An application on mangrove swamp meiofauna of Guadeloupe (F.W.I.). *Mar Environ Res* 69: 382-389.
- Mayrand, E., St-Jean, S. D., & Courtenay, S. C. (2005) Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: Can the immune system recuperate? *Aquac Res* 36: 962-971.
- McCue, M. D. (2010) Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156: 1-18.
- McFall-Ngai, M. J. (1998) Pioneering the squid-*Vibrio* model. *ASM News* 64: 639-645.
- McMullin, E. R., Bergquist, D. C., & Fisher, C. R. (2007) Metazoans in extreme environments: adaptations of hydrothermal vent and hydrocarbon seep fauna. *Gravit Space Biol Bull* 13: 13-23
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A., Barloy-Hubler, F., Galibert F., Kondorosi A., & Kondorosi E. (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5230-5235.
- Meyer, B., & Kuever, J. (2007) Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. *Appl Environ Microbiol* 73: 7664-7679.
- Meyer, B., Imhoff, J. F., & Kuever, J. (2007) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria - Evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environ Microbiol* 9: 2957-2977.
- Meyer, E., Nilkerd, B., Glover, E. A., & Taylor, J. D. (2008) Ecological importance of chemoautotrophic lucinid bivalves in a peri-mangrove community in eastern Thailand. *Raffles B Zool, Supplement* 18: 41-55.
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., & Blumenberg, M. (2002) Microbial reefs in the black sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* 297: 1013-1015.
- Mignucci-Giannoni, A. A., Hoberg, E. P., Siegel-Causey, D., & Williams Jr., E. H. (1998) Metazoan parasites and other symbionts of cetaceans in the Caribbean. *J Parasitol* 84: 939-946.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 165-199.
- Millero, F. J., Plese, T., & Fernandez, M. (1988) The dissociation of hydrogen sulfide in seawater. *Limnol Oceanogr* 269-274.
- Miyazaki, J.-I., de Oliveira Martins, L., Fujita, Y., Matsumoto, H., & Fujiwara, Y. (2010) Evolutionary process of deep-sea Bathymodiolus mussels. *PLoS ONE* 5: article n° e10363.

Miyazaki, M., Nogi, Y., Fujiwara, Y., Kawato, M., Kubokawa, K., & Horikoshi, K. (2008) *Neptunomonas japonica* sp. nov., an *Osedax japonicus* symbiont-like bacterium isolated from sediment adjacent to sperm whale carcasses off Kagoshima, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 866-871.

Mylona, P., Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869-885.

---

## N

---

Nakayama, K., Nomoto, A. M., Nishijima, M., & Maruyama, T. (1997) Morphological and Functional Characterization of Hemocytes in the Giant Clam *Tridacna crocea*. *J Invertebr Pathol* 69: 105-111.

Nelson, D. C., Hagen, K. D., & Edwards, D. B. (1995) The gill symbiont of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* is a psychrophilic, chemoautotrophic, sulfur bacterium. *Mar Biol* 121: 487-496.

Newmark, P. A., & Sánchez Alvarado, A. (2000) Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* 220: 142-153.

Nicholls, P., & Kim, J. K. (1981) Oxidation of sulphide by cytochrome aa3. *Biochim Biophys Acta* 637: 312-320.

Nishimoto, A., Mito, S., & Shirayama, Y. (2009) Organic carbon and nitrogen source of sunken wood communities on continental shelves around Japan inferred from stable isotope ratios. *Deep-Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 56: 1683-1688.

Nussbaumer, A. D., Fisher, C. R., & Bright, M. (2006) Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* 441: 345-348.

Nyholm, S. V., & McFall-Ngai, M. J. (2004) The winnowing: Establishing the squid - *Vibrios* symbiosis. *Nat Rev Microbiol* 2: 632-642.

---

## O

---

Oliver, G., Rodrigues, C. F., & Cunha, M. R. (2011) Chemosymbiotic bivalves from the mud volcanoes of the Gulf of Cadiz, NE Atlantic, with descriptions of new species of Solemyidae, Lucinidae and Vesicomidae. *ZooKeys* 113: 1-38.

Olivereau, M., & Olivereau, J. M. (1997) Long-term starvation in the European eel: General effects and responses of pituitary growth hormone-(GH) and somatolactin-(SL) secreting cells. *Fish Physiol Biochem* 17: 261-269.

Olu-Le Roy, K., Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Gofas, S., Salas, C., Mariotti, A., Fouchere, J-P. & Woodside J. (2004) Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: Composition, symbiosis and spatial distribution on mud volcanoes. *Deep-Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 51: 1915-1936.

Ott, J., Bright, M., & Bulgheresi, S. (2005) Marine microbial thiotrophic ectosymbioses. *Oceanogr Mar Biol* 42: 95-118.

Oubella, R., Maes, P., Allam, B., Paillard, C., & Auffret, M. (1996) Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquatic Living Resour* 9: 137-143.

Overmann, J. (2006) Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of Prokaryotes. *The Prokaryotes*, 1: 80–136.

## P

---

Paillard, C. (2004) A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resour* 17: 467-475.

Paillard, C., & Maes, P. (1990) Etiology of the brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity of a *Vibrio* sp. *C R Acad Sci Ser III* 310: 15-20.

Pailleret, M., Haga, T., Petit, P., Privé-Gill, C., Saedlou, N., Gaill, F., & Zbinden, M. (2007) Sunken wood from the Vanuatu Islands: Identification of wood substrates and preliminary description of associated fauna. *Mar Ecol* 28: 233-241.

Passos, F. D., De Lima Curi Meserani, G., & Gros, O. (2007) Structural and ultrastructural analysis of the gills in the bacterial-bearing species *Thyasira falklandica* (Bivalvia, Mollusca). *Zoomorphology* 126: 153-162.

Paull, C. K., Hecker, B., Commeau, R., Freeman-Lynde, R. P., Neumann, C., Corso, W. P., J. Hook., Sikes, E., & Curray J. (1984) Biological communities at the Florida Escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science* 226: 965-967.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., Schattenhofer, M., & Amann, R. (2002) Identification of DNA-synthesizing bacterial cells in coastal North Sea plankton. *Appl Environ Microbiol* 68: 5728-5736.

Perru, O. (2006) Aux origines des recherches sur la symbiose vers 1868-1883. *Revue d'histoire des sciences* 59: 5-27.

Pflugfelder, B., Cary, S. C., & Bright, M. (2009) Dynamics of cell proliferation and apoptosis reflect different life strategies in hydrothermal vent and cold seep vestimentiferan tubeworms. *Cell Tissue Res* 337: 149-165.

Pietri, R., Lewis, A., León, R. G., Casabona, G., Kiger, L., Yeh, S.-R., Marden, M., Carmen, C., & Lopez-Garriga, J. (2009) Factors controlling the reactivity of hydrogen sulfide with hemeproteins. *Biochemistry* 48: 4881-4894.

Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011) The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1813: 1619-1633.

Popham, J. D., & Dickson, M. R. (1973) Bacterial associations in the teredo *Bankia australis* (Lamellibranchia: Mollusca). *Mar Biol* 19: 338-340.

Powell, M. A., & Somero, G. N. (1985) Sulfide oxidation occurs in the animal tissue of the gutless clam, *Solemya reidi*. *Biol Bull* 169: 164.

Powell, M. A., & Somero, G. N. (1986) Adaptations to Sulfide by Hydrothermal Vent Animals: Sites and Mechanisms of Detoxification and Metabolism. *Biol Bull* 171: 274-290.

Prechtel, J., Kneip, C., Lockhart, P., Wenderoth, K., & Maier, U.-G. (2004) Intracellular spheroid bodies of *Rhopalodia gibba* have nitrogen-fixing apparatus of cyanobacterial origin. *Mol Biol Evol* 21: 1477-1481.

## R

---

Rai, A. N., Söderbäck, E., & Bergman, B. (2000) Cyanobacterium - Plant symbioses. *New Phytol* 147: 449-481.

Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., Buckingham-Meyer, K., & Stewart, P. (2007) Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 189: 4223-4233.

Rau, G. H. (1981a) Hydrothermal vent clam and tube worm  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ : Further evidence of nonphotosynthetic food sources. *Science* 213: 338-340.

Rau, G. H. (1981b) Low  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  in hydrothermal vent animals: Ecological implications. *Nature* 289: 484-485.

Rau, G. H., & Hedges, J. I. (1979) Carbon-13 depletion in a hydrothermal vent mussel: Suggestion of a chemosynthetic food source. *Science* 203: 648-649.

Reade, P., & Reade, E. (1976) Phagocytosis in invertebrates: studies on the hemocytes of the clam *Tridacna maxima*. *J Invertebr Pathol* 28: 281-290.

Reid, R. G. B., & Brand, D. G. (1986) Sulfide-oxidizing symbiosis in Lucinaceans! implications for bivalve evolution. *The Veliger* 29: 3-24.

Reynolds, L. K., Berg, P., & Zieman, J. C. (2007) Lucinid clam influence on the biogeochemistry of the seagrass *Thalassia testudinum* sediments. *Estuar Coasts* 30: 482-490.

Riley, R. T. (1976) Changes in the total protein, lipid, carbohydrate, and extracellular body fluid free amino acids of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during starvation. *Proc Nat Shelfish Ass* 65: 84-90.

Robidart, J. C., Bench, S. R., Feldman, R. A., Novoradovsky, A., Podell, S. B., Gaasterland, T., Allen E. & Felbeck, H. (2008) Metabolic versatility of the *Riftia pachyptila* endosymbiont revealed through metagenomics. *Environ Microbiol* 10: 727-737.

Rodrigues, C. F., & Duperron, S. (2011) Distinct symbiont lineages in three thyasirid species (Bivalvia: Thyasiridae) from the eastern Atlantic and Mediterranean Sea. *Naturwissenschaften* 98: 281-287.

Rodriguez, M., & Schaper, J. (2005) Apoptosis: Measurement and technical issues. *J Mol Cell Cardiol* 38: 15-20.

Rottner, K., Stradal, T. E. B., & Wehland, J. (2005) Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: Stories on actin cytoskeleton subversion. *Dev Cell* 9: 3-17.

- Rouse, G. W., Goffredi, S. K., & Vrijenhoek, R. C. (2004) *Osedax*: Bone-eating marine worms with dwarf males. *Science* 305: 668-671.
- Rouse, G. W., Wilson, N. G., Goffredi, S. K., Johnson, S. B., Smart, T., Widmer, C., Yong, C., Vrijenhoek, R. (2009) Spawning and development in *Osedax* boneworms (Siboglinidae, Annelida). *Mar Biol* 156: 395-405.
- Ruby, E. G., & Lee, K.-H. (1998) The *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ association: Current ecological paradigms. *Appl Environ Microbiol* 64: 805-812.
- Ruby, E. G., & Nealson, K. H. (1976) Symbiotic association of *Photobacterium fischeri* with the marine luminous fish *Monocentris japonica*; a model of symbiosis based on bacterial studies. *Biol Bull* 151: 574-586.

## S

---

- Salas, C., & Woodside, J. (2002) *Lucinoma kazani* n. sp. (Mollusca: Bivalvia): Evidence of a living benthic community associated with a cold seep in the Eastern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 49: 991-1005.
- Salerno, J. L., Macko, S. A., Hallam, S. J., Bright, M., Won, Y. J., McKiness, Z., & Van Dover, C. L. (2005) Characterization of symbiont populations in life-history stages of mussels from chemosynthetic environments. *Biol Bull* 208: 145.
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2003) Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 15: 763-770.
- Seger, R., & Krebs, E. G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735.
- Sharp, K. H., Eam, B., John Faulkner, D., & Haygood, M. G. (2007) Vertical transmission of diverse microbes in the tropical sponge *Corticium* sp. *Appl Environ Microbiol* 73: 622-629.
- Shively, J. M. (1974) Inclusion bodies of prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* 28: 167-187.
- Sibuet, M., & Olu, K. (1998) Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 45: 517-567.
- Smith, D. C., & Douglas, A. E. (1987) *The biology of symbiosis*. 302p. Edward Arnold, Londres.
- Smith, C. R., & Baco, A. (2003) Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 41: 311-354.
- Southward, E. C. (1986) Gill symbionts in thyasirids and other bivalve molluscs. *J Mar Biol Assoc U K* 66: 889-914.
- Spiridonova, E. M., Kuznetsov, B. B., Pimenov, N. V., & Turova, T. P. (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.

- Stadelmann, C., & Lassmann, H. (2000) Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 301: 19-31.
- Stat, M., Morris, E., & Gates, R. D. (2008) Functional diversity in coral–dinoflagellate symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9256.
- Stewart, F. J., & Cavanaugh, C. M. (2006) Bacterial endosymbioses in *Solemya* (Mollusca: Bivalvia) - Model systems for studies of symbiont-host adaptation. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 90: 343-360.
- Stewart, F. J., Young, C. R., & Cavanaugh, C. M. (2008) Lateral symbiont acquisition in a maternally transmitted chemosynthetic clam endosymbiosis. *Mol Biol Evol* 25: 673-687.
- Stewart, F. J., Newton, I. L. G., & Cavanaugh, C. M. (2005) Chemosynthetic endosymbioses: Adaptations to oxic-anoxic interfaces. *Trends Microbiol* 13: 439-448.
- Suess, E. (1980) Particulate organic carbon flux in the oceans - Surface productivity and oxygen utilization. *Nature* 288: 260-263.
- Suzuki, I. (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can J Microbiol* 45: 97-105.
- Suzuki, Y., Sasaki, T., Suzuki, M., Nogi, Y., Miwa, T., Takai, K., Nealson, K. & Horikoshi, K. (2005) Novel chemoautotrophic endosymbiosis between a member of the *Epsilonproteobacteria* and the hydrothermal-vent gastropod *Alviniconcha* aff. *hessleri* (gastropoda: provannidae) from the Indian Ocean. *Appl Environ Microbiol* 71: 5440-5450.
- Szkaradkiewicz, A., Wal, M., Jaroszewski, J., & Jopek, A. (2000) Application of bromodeoxyuridine (BrdU)-labelled *Escherichia coli* strains in studies on their adherence to human endothelial cells. *World J Microbiol Biotechnol* 16: 85-86.

## T

---

- Tarasov, V. G., Gebruk, A. V., Mironov, A. N., & Moskalev, L. I. (2005) Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: Two different phenomena? *Chem Geol* 224: 5-39.
- Taupin, P. (2007) BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53: 198-214.
- Taylor, J. D., & Glover, E. A. (2006) Lucinidae (Bivalvia) - The most diverse group of chemosymbiotic molluscs. *Zool J Linn Soc* 148: 421-438.
- Tepper, O. M., Sealove, B. A., Murayama, T., & Asahara, T. (2003) Newly Emerging Concepts in Blood Vessel Growth: Recent Discovery of Endothelial Progenitor Cells and Their Function in Tissue Regeneration. *J Invest Med* 51: 353-359.
- Thorsen, B. K., Enger, O., Norland, S., & Hoff, K. A. (1992) Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. *Appl Environ Microbiol* 58: 1624-1628.

- Tighilet, B., Brezun, J. M., Dit Duflo S., G., Gaubert, C., & Lacour, M. (2007) New neurons in the vestibular nuclei complex after unilateral vestibular neurectomy in the adult cat. *Eur J Neurosci* 25: 47-58.
- Torreiro, A., Martínez-Expósito, M. J., Trucco, M. I., & Pasantes, J. J. (1999) Cytogenetics in *Brachidontes rodriguezii* d'Orb (Bivalvia, Mytilidae). *Chromosome Res* 7: 49-55.
- Travers, M., Bouffant, R. L., Friedman, C. S., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., Koken, M. & Paillard, C. (2009) Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *J Cell Biochem* 106: 152-160.
- Tunncliffe, V., Juniper, S. K., & Sibuet, M. (2003) Reducing environments of the deep-sea floor. *Ecosystems of the deep oceans*. P. A. Tyler 81-110 Elsevier press. Amsterdam.
- Tuntiwaranuruk, C., Chalermwat, K., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., & Azevedo, C. (2004) Investigation of *Nematopsis* spp. oocysts in 7 species of bivalves from Chonburi Province, Gulf of Thailand. *Dis Aquatic Org* 58: 47-53.
- Turner, J. R., White, E. M., Collins, M. A., Partridge, J. C., & Douglas, R. H. (2009) Vision in lanternfish (Myctophidae): Adaptations for viewing bioluminescence in the deep-sea. *Deep-Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 56: 1003-1017.
- Turner, R. D. (1973) Wood-boring bivalves, opportunistic species in the deep sea. *Science* 180: 1377-1379.

## V

---

- Van Dover, C. (2000) *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton Univ Press, Princeton, New Jersey. 424p.
- Van Dover, C. L., Fry, B., Grassle, J. F., Humphris, S., & Rona, P. A. (1988) Feeding biology of the shrimp *Rimicaris exoculata* at hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol* 98: 209-216.
- Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59: 124-142.
- Veiga, E., & Cossart, P. (2005) *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nature Cell Biol* 7: 894-900.
- Verna, C., Ramette, A., Wiklund, H., Dahlgren, T. G., Glover, A. G., Gaill, F., & Dubilier, N. (2010) High symbiont diversity in the bone-eating worm *Osedax mucofloris* from shallow whale-falls in the North Atlantic. *Environ Microbiol* 12: 2355-2370.
- Vetter, R. D. (1985) Elemental sulfur in the gills of three species of clams containing chemoautotrophic symbiotic bacteria: a possible inorganic energy storage compound. *Mar Biol* 88: 33-42.
- Von Cosel, R., & Marshall, B. A. (2003) Two new species of large mussels (Bivalvia: Mytilidae) from active submarine volcanoes and a cold seep off the eastern North Island of New Zealand, with description of a new genus. *Nautilus* 117: 31-46.

Vrijenhoek, R. C., Duhaime, M., & Jones, W. J. (2007) Subtype variation among bacterial endosymbionts of tubeworms (Annelida: Siboglinidae) from the Gulf of California. *Biol Bull* 212: 180-184.

---

## W

---

Waterbury, J. B., Calloway, C. B., & Turner, R. D. (1983) A cellulolytic nitrogen-fixing bacterium cultured from the gland of Deshayes in shipworms (Bivalvia: Teredinidae). *Science* 221: 1401-1403.

Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005) Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 319-346.

Wei, S. L., & Young, R. E. (1989) Development of symbiotic bacterial bioluminescence in a nearshore cephalopod, *Euprymna scolopes*. *Mar Biol* 103: 541-546.

Wenzel, M., Radek, R., Brugerolle, G., & König, H. (2003) Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis. *Eur J Protistol* 39: 11-23.

Whiteside, G., & Munglani, R. (1998) TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: An improved method for detection of apoptosis in tissue sections - An update. *Brain Res Protoc* 3: 52-53.

Whyte, J. N. C., Englar, J. R., & Carswell, B. L. (1990) Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquaculture* 90: 157-172.

Willingham, M. C. (1999) Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 47: 1101-1109.

Windoffer, R., & Giere, O. (1997) Symbiosis of the hydrothermal vent gastropod *Ifremeria nautiliei* (Provannidae) with endobacteria - Structural analyses and ecological considerations. *Biol Bull* 193: 381-392.

Won, Y.-J., Jones, W. J., & Vrijenhoek, R. C. (2008) Absence of cospeciation between deep-sea mytilids and their thiotrophic endosymbionts. *J Shellfish Res* 27: 129-138.

Won, Y.-J., Hallam, S. J., O'Mullan, G. D., Pan, I. L., Buck, K. R., & Vrijenhoek, R. C. (2003) Environmental Acquisition of Thiotrophic Endosymbionts by Deep-Sea Mussels of the Genus *Bathymodiulus*. *Appl Environ Microbiol* 69: 6785-6792.

---

## Z

---

Zal, F., Leize, E., Oros, D. R., Hourdez, S., Dorsselaers, A. V., & Childless, J. J. (2000) Haemoglobin structure and biochemical characteristic of the sulphide-binding component from the deep-sea clam *Calypptogena magnifica*. *Cah Biol Mar* 41: 413-423.

- Zal, F., Leize, E., Lallier, F. H., Toulmond, A., Van Dorsselaer, A., & Childress, J. J. (1998) S-sulfohemoglobin and disulfide exchange: The mechanisms of sulfide binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8997-9002.
- Zaldibar, B., Cancio, I., & Marigómez, I. (2008) Epithelial cell renewal in the digestive gland and stomach of mussels: Season, age and tidal regime related variations. *Histol Histopathol* 23: 281-290.
- Zaldibar, B., Cancio, I., & Marigómez, I. (2004) Circatidal variation in epithelial cell proliferation in the mussel digestive gland and stomach. *Cell Tissue Res* 318: 395-402.

## ANNEXE

### Nathalie Hortensia ELISABETH

[nathalie.elisabeth@univ-ag.fr](mailto:nathalie.elisabeth@univ-ag.fr)

05/07/1982

#### PARCOURS UNIVERSITAIRE

- Actuellement en troisième année de thèse à l'université des Antilles et de la Guyane (Pointe à Pitre, 971) sur le sujet : Plasticité tissulaire et cellulaire du filament branchial des bivalves côtiers symbiotiques *Codakia orbiculata* et *Lucina pensylvanica*:
- 2007-2008 Deuxième année de Master Biodiversité tropicale parcours marin mention Assez Bien (Pointe à Pitre, 971)
- 2006-2007 Première année de Master d'océanographie spécialité biologie et écologie marines à l'université Aix-Marseille II mention Assez Bien (Marseille, 13)
- 2005-2006 Licence de biologie marine à l'université de La Rochelle (La Rochelle, 17)
- 2004-2005 DEUG SV à l'université de la Réunion (Ste Clotilde, 974)  
Brevet de secourisme
- 2002-2003 Première année de D.E.U.G SV à l'université des Antilles et de la Guyane (Pointe à Pitre, 971)
- 2000 Baccalauréat scientifique mention Bien au Lycée Montgérald (Marin, 972)

#### STAGES

- 2008 *Mécanismes cellulaires de la plasticité du filament branchial chez le modèle symbiotique Codakia orbiculata lors d'un stress environnemental*  
Stage **obligatoire** de 6 mois au laboratoire SAE UMR7138 de l'université des Antilles et de la Guyane.  
Techniques utilisées : immunohistochimie, CARD-FISH...
- 2006 *Expérience préliminaire à la mise en place d'un protocole d'élevage de l'hydroméduse Clytia maccradyi.*  
Stage **obligatoire** de 5 semaines prolongé à 9 semaines au laboratoire ECOMAR de l'Université de la Réunion durant lequel j'ai contribué à l'élaboration d'un protocole permettant l'élevage de *Clytia maccradyi*.  
  
*Suivi physico-chimique des bassins d'élevage d'ombrine tropicale.*  
Stage **volontaire** d'une durée d'un mois et demi au laboratoire d'aquaculture tropicale de l'IFREMER Martinique durant lequel j'ai réalisé un suivi des nitrates, de l'ammoniac et de la température sur les bassins de géniteurs et de quarantaine de *Sciaenops ocellatus*.
- 2005 *Montage d'un aquarium à Hydraires*  
Stage **volontaire** en binôme d'une durée de 2 mois au laboratoire ECOMAR de l'université de la Réunion durant lequel j'ai travaillé à la mise en place d'un aquarium spécifique reproduisant au mieux les conditions du milieu naturel et permettant l'élevage des espèces de la famille des Aglaopheniidae.

### *Animation scientifique*

Stage **volontaire** effectué au sein de l'association Sciences Réunion pour la vulgarisation scientifique dans les établissements scolaires.

2004 *Etude de la biologie de Beauveria brongnartii, champignon entomoanthropathogène du ver blanc de la canne à sucre.*

Stage **volontaire** en binôme d'une durée de 7 mois à l'UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical de l'université de la Réunion durant lequel j'ai travaillé à la mise en culture du champignon, à l'étude de sa croissance ainsi qu'à la réalisation d'une iconographie.

## COMPETENCES TECHNIQUES

**Biologie moléculaire:** techniques d'hybridation moléculaire (FISH et CARD-FISH)

**Histologie :** Fixation, inclusion/coupes en paraffine et Steedman's wax (microtome), cryomicrotomie, résine, colorations histologiques

**Immunologie:** immunohistochimie, immunocytochimie

**Protéomique:** dosage des protéines totales et protéines soufrées. Immunolocalisation

**Microscopie:** Microscopie optique incluant la microscopie à fluorescence

**Microbiologie:** culture d'*Escherichia coli* et *Citrobacter* sp / purification des symbiotes bactériens de Lucinidae

**Informatique:** outil de navigation internet/ Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint) et Open Office (Writer, Calc, impress)/ GIMP et Image J/ Refworks.

**Langues:** français et créole (langues maternelles)/ Anglais

**Autres:** brevet de secourisme et permis de conduire (B)

## PUBLICATIONS

### **Publications internationales à comité de lecture**

-O. Gros, N.H. Elisabeth, S.D.D. Gustave, A. Caro and N. Dubilier. Plasticity of symbiont acquisition throughout the life cycle of the shallow-water tropical lucinid *Codakia orbiculata* (Mollusca: Bivalvia). Accepté sous réserve de modification dans Environmental microbiology.

-N.H Elisabeth, S.D.D Gustave and O. Gros. Cell proliferation and apoptosis in gill filaments of the lucinid *Codakia orbiculata* (Mollusca: Bivalvia) during bacterial decolonization and recolonization. Soumis à Microscopy Research and Technique.

### **Communications orales dans des congrès internationaux**

N.H Elisabeth, M-N Sylvestre, S.D.D Gustave, P. Jean-Louis, T. Césaire, A. Caro, J-L Mansote and O. Gros. Monitoring of sulfur-oxidizing endosymbiotic bacterial population inhabiting the tropical lucinid *Codakia orbiculata* during starvation and bacterial recruitment. ASLO aquatic science meeting, 2011, San Juan, Puerto-Rico.

### **Communications orales dans des séminaires nationaux**

S.D.D. Gustave, N.H. Elisabeth, B. Lemauff and O. Gros 2008. Les Lucinidae tropicaux côtiers comme modèles d'étude des symbioses chimio-autotrophes en milieux réduits : Intérêt pour l'étude de la plasticité du tissu hôte et ses interactions avec les bactéries symbiotiques. Day of research at the University of Les Antilles-Guyane.

### **Posters dans des congrès internationaux**

N.H. Elisabeth, S.D.D. Gustave and O. Gros 2008. Cellular mechanisms underlying gill-endosymbiotic bacterial infection process within shallow water *Codakia orbiculata* (Bivalvia: Lucinidae) (Montagu, 1802). 61ème conférence annuelle du Gulf Caribbean Fisheries Institute, Gosier, Guadeloupe.

S.D.D. Gustave, N.H. Elisabeth and O. Gros 2008. Cell interactions induced by bacterial infection processes within the lateral zone of gill filaments of the lucinid *Codakia orbiculata*. 20ème conférence annuelle de l'International Congress of Zoology, Paris, France.

### **Posters dans des congrès nationaux**

A. Caro, N.H. Elisabeth, P. Got and O. Gros 2010. Effet de la carence nutritive à long terme sur les populations bactériennes endosymbiotiques hébergées par 2 bivalves tropicaux et conséquence de la remise dans le sédiment. Congrès Ecologie 2010, Montpellier, France.

N.H. Elisabeth, M-N Sylvestre, S.D.D. Gustave, P. Jean-Louis, T. Césaire, A. Caro, J-L Mansot et O. Gros 2010. Effet de la carence nutritive sur la branchie du bivalve symbiotique côtier *Codakia orbiculata*. Congrès Ecologie 2010, Montpellier, France.





## **PLASTICITE TISSULAIRE ET CELLULAIRE DU FILAMENT BRANCHIAL DES LUCINIDAE SYMBIOTIQUES COTIERS *CODAKIA ORBICULATA* ET *LUCINA PENNSYLVANICA*.**

La zone latérale des filaments branchiaux des espèces de bivalves littoraux *Codakia orbiculata* et *Lucina pensylvanica* est le lieu d'une symbiose chimioautotrophe avec des bactéries sulfo-oxydantes hébergées dans des cellules spécialisées, appelées bactériocytes. L'équilibre existant entre les bactériocytes et les autres types cellulaires du filament branchial peut être fortement perturbé en fonction de la quantité de symbiotes présents dans la branchie. Dans le cadre de ce travail de thèse nous nous sommes proposés de déterminer les mécanismes qui sous-tendent la plasticité cellulaire et tissulaire observée, au sein de la zone latérale des filaments branchiaux, au cours des processus de décolonisation et de recolonisation bactérienne. Pour ce faire, des individus collectés dans leur milieu naturel, ont été maintenus au laboratoire dans des bacs d'eau de mer filtrée en absence de nourriture et de soufre réduit, afin de provoquer la décolonisation bactérienne des filaments branchiaux. Lorsque la branchie apparaissait purgée de ses symbiotes, les individus ont été remis dans leur habitat naturel afin de provoquer la recolonisation de la branchie. L'analyse des branchies au cours de ces processus a fait appel à des techniques variées (histologie, immunohistochimie, hybridation *in situ*, cytométrie en flux, dosage des protéines totales, dosages des protéines soufrées et spectrométrie de fluorescence X). Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'acquisition environnementale mise en évidence chez les juvéniles des *Codakia* se poursuivait tout au long du cycle de vie des adultes. Cette étude a également permis une meilleure compréhension des mécanismes tissulaires sous-jacents à la plasticité du filament branchial en mettant en évidence les processus d'apoptose et de prolifération cellulaire qui ont lieu au cours des processus de décolonisation et de recolonisation. En effet, nous avons montré que le renouvellement des cellules hôtes de la branchie peut se faire à la fois par multiplication de bactériocytes existants et par différenciation de cellules a priori indifférenciées, retrouvées au niveau des ponts tissulaires de la branchie. Nos résultats montrent également que les phénomènes de décolonisation et de recolonisation bactériennes du filament branchial s'accompagnent d'une variation de la teneur en soufre élémentaire, ainsi que de la taille relative et du contenu génomique des symbiotes. Il serait intéressant de poursuivre ce travail par la recherche d'indices de la digestion enzymatique des symbiotes au cours de la décolonisation ainsi que la par la mise en évidence des processus de reconnaissance hôte-symbiote indispensables à l'initiation de l'association.

**Mots-clés :** acquisition des symbiotes, actine, apoptose, bactéries sulfo-oxydantes, herbier à *Thalassia testudinum*, histologie, hybridation *in situ*, immunohistochimie, prolifération cellulaire, symbiose chimiosynthétique.

## **TISSUE AND CELL PLASTICITY OF GILL FILAMENTS OF COASTAL SYMBIOTIC LUCINIDAE *CODAKIA ORBICULATA* AND *LUCINA PENNSYLVANICA*.**

The lateral zone of gills filaments of coastal bivalves *Codakia orbiculata* and *Lucina pensylvanica* is the site of chemoautotrophic symbiosis with sulfur-oxidizing bacteria, housed in specialized cells called bacteriocytes. The balance between bacteriocytes and the others cell types in the gill filament may be disrupted depending on the level of these symbionts in the gill. The objective of this thesis is to determine the mechanisms underlying cell plasticity and tissue plasticity observed in the lateral zone of gills filaments during the processes of bacterial decolonization and recolonization. In order to do this, the individuals collected in their natural habitat were maintained at the laboratory in seawater filtered tanks, without food and reduced sulfur, to cause bacterial decolonization. When the gills seemed to be purged, the individuals were returned to their natural habitat in order to cause the bacterial recolonization of gills filaments. The analysis of the gills during these processes involves several techniques (histology, immunohistochemistry, molecular hybridization, flow cytometry, total protein assays, protein sulfur assays, X-ray fluorescence spectrometry). This study shows that symbiont acquisition can occur during the entire life of *Codakia* bivalves. It also allows a better understanding of gills filaments plasticity by highlighting apoptosis and cell proliferation during decolonization and recolonization processes. Indeed, we showed that host cell renewal in gills can be done by bacteriocytes multiplication or by differentiation of a priori undifferentiated cells of tissular bridges. It should allow a better understanding of the biology of symbionts. It will be interesting to search for enzymatic digestion of symbionts during starvation and to investigate processes of host cell-symbiont recognition.

**Key-words :** actin, apoptosis, cell proliferation, chemosynthetic symbiosis, histology, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, symbionts acquisition, sulfur-oxydizing bacteria, *Thalassia testudinum*.