



université de bretagne
occidentale

UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Microbiologie.

École Doctorale des Sciences de la Mer.

présentée par

Stéphane L'Haridon

Préparée au Laboratoire de Microbiologie des
Environnements Extrêmes (LM2E-UMR6197 UBO-
CNRS-Ifremer)

Etude de la diversité microbienne des bassins hypersalés anoxiques profonds de la Mer Méditerranée orientale.

Thèse soutenue le 17 Mars 2017

devant le jury composé de :

Elizaveta Bonch-Osmolovskaya (Rapporteuse)

Professeur, Institut Winogradsky de Microbiologie, Russie.

Christian Tamburini (Rapporteur)

Directeur de Recherche, CNRS, Université Aix-Marseille, France.

Christian Jeanthon, (Examineur)

Directeur de Recherche, CNRS, Station Biologique de Roscoff,
France.

Gwenaëlle Le Blay, (Examinatrice)

Professeur, Université Bretagne-Loire, France.

Mohamed Jebbar, (Examineur)

Professeur, Université Bretagne-Loire, France.
Directeur de Thèse.

Laurent Toffin, (Examineur)

Chargé de Recherche, Ifremer, France.
Directeur scientifique de Thèse.

Remerciements

« Quoi que vous fassiez ou rêviez de faire, commencez-le. La qualité primordiale de l'audace est son génie, sa puissance et sa magie. »

William Hutchinson Murray: The Scottish Himalayan Expedition (1951).

Cette thèse est le fruit de mon engagement professionnel que je mène depuis que je suis tombé dans ce monde fascinant et exigeant de la recherche scientifique. C'est aujourd'hui que je mesure l'importance des rencontres qui ont jalonné mon parcours personnel et professionnel. Des rencontres riches en intensité aussi bien sur le point scientifique qu'humain, avec des personnes passionnées qui ont su me transmettre leur passion.

Dans ces rencontres, il y a ce professeur de mathématique au collège de Kerzouar, M^{me} Quentric. Je vous remercie d'avoir sauvé mon parcours scolaire en prenant le temps d'aller repêcher l'élève en difficulté que j'étais devant votre discipline. Le temps que vous m'avez consacré m'a permis de poursuivre dans le domaine des sciences. Soyez en remerciée aujourd'hui.

Ma première expérience dans le monde de la recherche s'est déroulée au cours de mon stage de fin d'étude d'IUT à la station biologique de Roscoff. Je débarquais dans cet univers pour étudier la corrosion en milieu marin associé aux bactéries sulfato-réductrices dans le laboratoire de microbiologie marine de Daniel Prieur. Sous la direction de Nadia Benbouzid-Rollet, j'appris les techniques de culture des microorganismes anaérobies et commençait les premières lectures d'ouvrages scientifiques et notamment ceux de Friedrich Widdel. Sachez Nadia qu'encore

aujourd'hui à mon tour, j'essaye d'enseigner la pratique de l'anaérobiose comme tu me l'as enseignée.

C'est aussi dans ce laboratoire que je découvre les environnements extrêmes et plus particulièrement les sources hydrothermales océaniques profondes découvertes depuis peu. J'appréhende les techniques de culture des microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sous la direction de Gael Erauso. Je participe ainsi à l'écriture de l'histoire de *Pyrococcus abyssi* souche GE5 dans le laboratoire. Gael, je te remercie de toutes ces discussions intéressantes et enrichissantes que nous avons le soir dans la cuisine de la Station. Discussions souvent centrées sur les travaux de K.O. Stetter...

La maîtrise des techniques est une chose, leur utilisation pour soutenir et répondre à une problématique scientifique en est une autre. De la chance, du hasard, être là au bon moment... L'étude de la diversité microbienne de puits pétroliers parisiens a été un moment important dans mes débuts professionnels non seulement sur l'impact des travaux réalisés mais surtout sur la rencontre avec un chercheur qui va m'aiguiller, développer mes compétences, assouvir ma soif de connaissance et surtout valoriser le fruit des travaux que je mène chaque jour. Christian, merci de la confiance que tu m'as donnée et que tu me donnes encore aujourd'hui.

Je développai donc pendant toutes ces années les techniques de culture des microorganismes dans le laboratoire sur les différents environnements extrêmes que nous étudions. La question étant comment cultiver l'incultivé que nous révélait les approches moléculaires en plein essor. A cette question, Joel Querellou, directeur du laboratoire, répondait par le développement d'une plateforme haut débit de culture, un projet que je qualifie aujourd'hui de fou, de très ambitieux... Je t'accompagnais dans cette aventure souvent passionnante, mais ô combien épuisante... De nos discussions, je retiens la finesse de tes positions, comme un très bon joueur d'échec tu avais toujours un coup d'avance. Et enfin cette citation que tu me disais quand le doute m'habitait : «A la fin le pessimiste aura peut-être raison mais l'optimiste aura mieux vécu. »...

Des nuits sans dormir, observer au microscope ce que l'on désire maîtriser et cultiver, chaque matin se remettre en question, chaque matin remettre du cœur à l'ouvrage, essayer, rééssayer encore et encore, des discussions, des hypothèses a n'en plus finir mais toujours cette passion qui t'habite et que tu sais si bien partagée...Merci Anna-Louise de me faire une place dans tes aventures et tes choix scientifiques au combien judicieux et brillant...Il y aura toujours une bonne bouteille de vin qui t'attendra dans ce petit coin de Bretagne que tu affectionnes...and CRABS !!!!!

La production primaire de la recherche est assurée par les étudiants, quelque soient leurs niveaux, ils participent à la reconnaissance du laboratoire à travers les travaux auxquels ils participent et portent. En tant que personnel technique dans le laboratoire, j'ai appris beaucoup de vous, en vous suivant dans vos démarches scientifiques et en essayant de suivre les nouvelles technologies ou approches que vous avez apportées au laboratoire. Merci Nadia, Gaël, Pascale, Patrick, Viggó, Erwan, Edmond, Claire, Nathalie, Laurent, Olivier, Cassandre, Adrien, Adeline, Pauline, Julien, Grégoire, Joonas, Maria, Frédérique, Matthieu, Coraline, Samuel, Tiphaine, Cécile, Gwendoline, Damien, Clarisse, Florian, Sarah, Sabrina...

A mes collègues, membre des personnels techniques et garant de la mémoire du laboratoire, je vous remercie de votre soutien au cours de ces nombreuses années : Nadège, Françoise, Valérie, Patricia, Josiane, Audrey, Sébastien, Etienne, Raphael, Mickael, Myriam, la Cocagne Team Morgane, Marie, Ouafae, Alexandre. Sans oublier le cœur du laboratoire avec les secrétaires qui nous facilitent le quotidien : Stéphanie et Christine.

Je remercie l'ensemble des chercheurs du laboratoire pour leur disponibilité, pour leur confiance et leur indulgence quand je monte dans les tours...

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mohamed Jebbar et Laurent Toffin qui ont accepté de me suivre et de m'encadrer dans cette aventure que constitue le doctorat.

Je remercie l'ensemble des membres du jury qui ont bien voulu participer à l'évaluation de ce travail de thèse.

Un grand merci à l'ensemble de mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours et surtout de votre bienveillance sur la fin. L'amour que vous me portez m'a permis d'arriver au bout

de ce chemin : Sonia et David, Nadia et Phil, Sonia, Bédime et Franck, Sophie et Christian, Flo et Alain, Popo et JeanJean, Sylvie et Pascal, Patricia et Bernard, Maryse et Vincent.

Si le travail de thèse représente un investissement intellectuel important ; c'est aussi un travail d'endurance que j'ai pu mener grâce aux collègues qui m'accompagnent régulièrement sur les sentiers de France et de Navarre : Bernard, Pascal, David, Mélanie, Denis, Romu, Christian, Mickael, Hervé, Jean-Yves, Serge, Christophe, Erwan, Edmond. Que le club des Cent Bornards s'agrandisse...

A ma famille. Maman, c'est souvent en pensant à toi, à la force que tu as eu de nous élever que j'ai, quand le doute m'envahissait, puiser la force de poursuivre ce travail. Jean, merci de prendre soin de ma Mère et d'apporter au quotidien toute cette énergie que tu possèdes. A mon frère, fort comme un roc tu es, merci de ton soutien. A ma sœur, tout simplement... « Ta deuxième vie commence quand tu comprends que tu n'en as qu'une... »

A mes filles, **Lisa** et **Zoé**, mes princesses. Ce que vous retiendrez, enfin je l'espère de ce travail, c'est que si vous croyiez en vous alors tout est possible dans la vie. Ne laissez jamais personne vous prétendre le contraire. Vos rêves, réalisez les, patiemment mais sûrement... Votre Papa qui avait bien souvent la tête dans les bactéries. Je vous Aime.

A mon **Epouse**, « Tu viendras longtemps marcher dans mes rêves, Tu viendras toujours du côté où le soleil se lève et si malgré ça j'arrive à t'oublier, J'aimerais quand même te dire, tout ce que j'ai pu écrire, Je l'ai puisé à l'encre de tes yeux ... »
Je suis et resterai ton LBM pour la vie.

CITIUS, ALTIUS, FORTIUS

Table des matières

Remerciements	1
Liste des figures	10
Liste des tableaux	14
Abréviations	15
INTRODUCTION GENERALE	19
I. Les environnements extrêmes	19
II. Les environnements hypersalés.	23
II.1. Introduction	23
II.2. Classification des microorganismes halophiles.	24
II.3. Taxonomie des microorganismes halophiles.	24
II.4. Distribution et datation des dépôts de sels anciens.....	26
II.5. Survie des microorganismes halophiles.	29
II.6. Dispersion et distribution des microorganismes halophiles.	31
II.7. Stratégie d'adaptation aux fortes pressions osmotiques.	32
II.8. Halophilie et exobiologie.	35
III. Les bassins hypersalés anoxiques profonds de Méditerranée.	37
III.1. Introduction	37
III.2. Crise Saline du Messinien.	38
III.3. Formation des bassins anoxiques profonds hypersalés (DHABs) de Méditerranée.	42
III.4. Caractéristiques physico-chimiques d'une saumure.	43
III.5. Détection des bassins hypersalés anoxiques profonds et échantillonnage des saumures.	46
IV. Ecologie microbienne des DHABs.	48
IV.1. Formation de la chemocline.	48
IV.2. Mesure et mise en évidence d'activités microbiennes dans les DHABs.	50
IV.3. Mesure de l'abondance microbienne.	52
IV.4. Diversité moléculaire dans les DHABs.	55
IV.5. Diversité microbienne cultivable dans les DHABs.....	61
IV.6. Hypothèse sur l'activité métabolique des divisions candidates MSBL1 and KB1.	64
V. La méthanogénèse.	70
V.1. Introduction	70
V.2. La classification phylogénétique des méthanogènes.	73

V.3. Les voies métaboliques de la méthanogenèse.	76
V.5. La méthanogénèse en milieu hypersalé.	86
VI. Approches culturelles.	89
Problématiques et objectifs	96
Matériels et méthodes.	99
I. Campagnes océanographiques et matériels de prélèvements.	99
I.1. Campagnes de prélèvement.	99
II. Conditionnement des échantillons.	100
II.1. Conditionnement des échantillons pour la culture microbienne.	100
II.2. Conditionnement des échantillons pour les analyses physico-chimiques.	100
II.3. Conditionnement des échantillons pour les approches moléculaires.	102
II.4. Conditionnement des échantillons pour les dénombrements cellulaires totaux en microscopie à épifluorescence.	102
III. Approche culturelle traditionnelle.	103
IV. Approche culturelle haut-débit.	107
VII. Observation microscopique.	109
VI. Isolement et caractérisation des isolats du genre <i>Methanohalophilus</i>	110
VI.1. Milieu et conditions de cultures.....	110
VI.1.1. Préparation du milieu de culture liquide.	110
VI.1.2. Préparation du milieu solide.	111
VI.2. Détermination des conditions optimales de croissance.	112
VI.3. Croissance sous pression hydrostatique.	113
VII. Détermination de la croissance microbienne.	115
VII.1. Mesure de la densité optique par spectrométrie.	115
VII.2. Détermination de la concentration cellulaire par cytométrie de flux.	115
VII.3. Détection de croissance dans des microplaques de Culture.	115
Stabilité des ARNs en conditions hypersalées.	116
VIII.	116
IX. Méthode Moléculaire.	117
IX.1. Extraction d'ADN.	117
IX.2. Extraction d'ADN pour le séquençage de génome.	117
IX.3. Extraction d'ADN/ARN sur les cartouches filtrantes (filtre Sterivex).	118
IX.4. Extraction des ARN et purification des ARNs à partir de cultures.	119
IX.5. Quantification des acides nucléiques.....	120

IX.6. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR.	120
IX.7. Amplification par RT-PCR du gène ARNr 16S.	121
IX.8. Amplification « nichée » par PCR en vue de l'analyse en DGGE.	122
IX.9. Clonage des produits d'amplification PCR.	123
IX.10. Electrophorèse d'ADN.	124
IX.11. Analyse des produits de PCR par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).	124
X. Séquençage des génomes.	126
X.1. Méthodes de séquençage.	126
X.2. Assemblage et analyse des génomes.	129
X.3. Hybridation ADN/ADN <i>in silico</i>	129
X.4. Détermination des valeurs d'identité nucléotidiques moyennes (ANI).	129
Résultats et discussion.	131
I. Diversité microbienne cultivable dans les bassins profonds hypersalés anoxiques de la Mer Méditerranée.	132
I.1. Approches culturelles traditionnelles.	132
I.2. Approches culturelles innovantes dites haut-débits.	139
II. Isolement et caractérisation physiologique de 3 souches méthanogènes à partir des bassins profonds anoxiques hypersalés de la Mer Méditerranée.	144
II.1. Isolement des souches appartenant au genre <i>Methanohalophilus</i> à partir des bassins profonds hypersalés de Mer Méditerranée.	144
II.2. Observation morphologique des trois souches méthanogènes isolées en culture pure.	145
II.3. Caractéristiques physiologiques des souches méthanogènes du genre <i>Methanohalophilus</i>	146
II.4. Effets de la pression hydrostatique sur la croissance des souches méthanogènes halophiles. ...	152
II.5. Analyse phylogénétique des souches méthanogènes halophiles à partir des gènes codant pour l'ARN 16S et le mcrA (méthyl coenzyme M réductase).	156
III. Etude la diversité microbienne dans le Bassin Tyro.	160
III.1. Dénombrements cellulaires.	160
III.2. Extraction des ARNs à partir des cartouches filtrantes.	161
III.3. Evolution des communautés microbiennes en fonction de la salinité analysée par DGGE.....	162
III.4. Diversité microbienne des communautés « actives » dans le bassin Tyro.	163
IV. Stabilité des ARNs en condition hypersalé.....	167
V. Etude des génomes des souches appartenant au genre <i>Methanohalophilus</i>	169
V.1. Annonce du génome de <i>Methanohalophilus halophilus</i> DSM 3094 ^T (Genome Announcements, article sous presse).	171
V.2. Annonce du génome de <i>Methanohalophilus portucalensis</i>	175

V.3. Présentation des génomes des souches <i>M. SLHTYRO</i> , <i>M. SLHKRYOS</i> et <i>M. SLHTHETIS</i> isolées des bassins hypersalés profonds et anoxiques Tyro, Kryos et Thetis de la Mer Méditerranée.	185
Conclusions et perspectives.	192
Bibliographie	200
Annexe.	221
Annexe 1: Présentation du chapitre du livre rédigé pour le livre « The Marine Microbiome ».	221
Annexe 2 : Préparation des solutions de lyse et dénaturantes.	257
Annexe 3 : Table de Mac Crady	258
Annexe 4 : Préparation des solutions dénaturantes pour la DGGE.	259
Annexe 5: Présentation de l'article (La Cono et al., 2011) avec les résultats des approches culturelles.	260

Liste des figures

Figure 1: A) Photomicrographie en microscopie électronique à balayage de l'espèce <i>Salinibacter ruber</i> (échelle 2,5 µm). B) Photomicrographie au microscope à contraste de phase de <i>Dunaliella salina</i> (échelle 10 µm).	19
Figure 2: A) Source chaude du Parc de Yellowstone (USA). B) Cheminée hydrothermale observée dans l'Océan Indien (champ Kairei).	20
Figure 3: Représentation de la croissance microbienne en fonction de la pression hydrostatique.	22
Figure 4: Marais salant de Eilat, Israël. La couleur rouge est observée dans les bassins les plus salins avec sur les bords du bassin des cristaux de sels.	23
Figure 5: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S. Les rectangles bleus indiquent la présence d'au moins un microorganisme halophile dans le groupe.	26
Figure 6: Représentation de l'évaporation totale d'une colonne d'eau de mer de 1000 m.	27
Figure 7: Photographie de fluide d'inclusion d'halite et de microorganismes. A,B, C microscopie optique ; D, E, F microscopie électronique à transmission. B, C, E les microorganismes sont visibles dans le cristal. (D'après Schubert et al., 2009).	31
Figure 8: Représentation de certains solutés compatibles utilisés par les microorganismes dans la stratégie "Salt-out".	34
Figure 9: Présence du réflecteur M qui correspond sur l'image au « Top of Messinian evaporites » d'après Cita, 2006.	38
Figure 10: bilan hydrique du bassin Méditerranéen.	39
Figure 11: Distribution des évaporites en Méditerranée. En rose les dépôts de gypse, en rouge les dépôts de Halites, de potassium et de magnésium.	41
Figure 12: Corrélation entre les principaux changements hydrologiques, climatiques et les dépôts d'évaporites en Mer Méditerranée d'après Rouchy, 2006.	41
Figure 13: Localisation des bassins anoxiques profonds (DHABs) de Méditerranée (d'après Yakimov, 2013).	43
Figure 14: Représentation des différents dépôts de sels en Mer Méditerranée d'après Rouchy, 2006.	45
Figure 15: A gauche superposition du profil sismique et du profil CTD. En bleu le profil de salinité, en rouge le profil de température. A droite la reconstruction en 3D du bassin Thetis, bassin mis en évidence par la couleur bleue (d'après La Cono, 2011).	47
Figure 16: Schéma opérationnel du déploiement du MODUS et du SCIPACK à partir du navire de Recherche. A : mise à l'eau du SCIPACK. B : Déploiement du MODUS avec le SCISKID. (D'après Malinverno, 2006).	48
Figure 17: Représentation de l'halocline du bassin Thetis d'après La Cono, 2011. Les cylindres T1, T2 et T3 représentent les zones de prélèvements réalisés avec les bouteilles Niskin.	49
Figure 18: Chemocline du bassin Medee d'après Yakimov, 2013, illustrant la présence de plusieurs saumures (L1 à L4) de salinité croissante.	50
Figure 19: Profils de salinité et de température au-dessus du volcan de boue dans le bassin Urania (b). La flèche jaune indique la présence du volcan sous la saumure du bassin Urania (d'après Yakimov, 2007).	50
Figure 20: Evolution de l'abondance bactérienne dans le bassin Thetis d'après La Cono, 2011.	53
Figure 21: Profil d'abondance microbien en fonction de la profondeur à l'aide d'un intercalant de l'ADN (Dapi, Jaune) et de sondes spécifiques des <i>Bacteria</i> et <i>Archaea</i> d'après Yakimov, 2013.	55
Figure 22: Expérience démontrant la stabilité des ADN, ARN, mRNA en condition hypersalée au cours du temps (d'après Hallsworth, 2007). Dans le cadre C, on observe d'une part que l'ADNr 16S est amplifié et rétro-transcrit jusqu'à 45 jours d'incubation et d'autre part que la rétro-transcription et l'amplification du gène gyrB est négative dès 24 heures d'incubation.	57
Figure 23: Diversité phylogénétique microbienne du DHAB Medee. La stratification et l'abondance relative de chaque groupe phylogénétique en fonction des différentes zones de l'halocline sont indiquées sous forme de pourcentage d'abondances relatives (d'après Yakimov, 2013).	60
Figure 24: Hypothèse d'une relation trophique entre deux partenaires (membres des divisions candidates KB1 et MSBL1) pour l'utilisation de la glycine bêtaïne via le TMA. (D'après Yakimov, 2013).	65
Figure 25: Arbre phylogénétique construit selon la méthode du Maximum-Likelihood obtenue à partir des ARNr16S complets présents dans les génomes amplifiés (SAGs) et les ARNr16S présents dans la banque de donnée GenBank (Mwirichia et al., 2016). En rouge, les séquences des ARNr 16S retrouvés dans les	

génomés des cellules séquencées. En bleu, des séquences environnementales des ARNr 16S de la division candidate MSBL1 (origine DHABs de la Mer Rouge).	66
Figure 26: Schéma putatif du métabolisme global des membres de la division candidate MSBL1 basé sur l'analyse des 32 génomes de cellules uniques amplifiées (SAGs) (d'après Mwirichia, 2016). La figure résume les différentes voies métaboliques mises en évidence : glycolyse, néoglucogénèse, fixation autotrophe du CO ₂ , l'assimilation des C1 suivant la voie du tetrahydrofolate/tetramethanohydropterine.	67
Figure 27: Représentation de la voie de clivage proposée par Nigro (2016) de la Betaïne chez les représentants des KB1. Enzyme Commission number (EC) and protein encoding gene (peg) identification number in RAST are noted where available. Etape 1, ATP binding cassette; étape 2, triméthylamine méthyltransferase, étape 3, méthylène-THF reductase. Etape 4, méthylène-THF dehydrogenase. Etape 5, méthényl-THF-cyclohydrolase. Etape 6, formyl-THF-ligase. Etape 7, formate dehydrogenase. Etape 8, 5-méthyl-THF:corrinoid méthyltransferase. Etape 9, complexe carbone monoxide dehydrogenase (CODH) et acetyl-coA synthase (ACS).	69
Figure 28: Arbre phylogénétique représentant les 3 domaines du vivant, basé sur l'analyse des séquences de l'ARN ribosomal (d'après Woese, 1990).	71
Figure 29: Le méthane dans le cycle global du carbone (d'après Thauer et al., 2008).	72
Figure 30: Position phylogénétique des 7 ordres des méthanogènes (en rouge) plus le nouvel ordre des <i>Methanomassiliicoccales</i> basée sur l'analyse des ARN ribosomiaux. (D'après Borrel, 2014).	74
Figure 31: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse du gène mcrA indiquant la position phylogénétique du nouveau phylum Candidat <i>Verstraetearchaeota</i> . (D'après Vanwonterghem, 2016).	75
Figure 32: Phylogénie des <i>Archaea</i> à partir des génomes disponibles avant 2012 (A) et actuel (B). Les flèches rouges indiquent l'origine déduite de la méthanogénèse avec les futures divergences conduisant aux lignées qui ont gardés ce métabolisme ou la présence des homologues du gène mcr sont retrouvés (d'après Borrel, 2016). TACK : <i>Thaumarchaeota</i> , <i>Aigarchaeota</i> , <i>Crenarchaeota</i> , <i>Korarchaeota</i>	76
Figure 33: Schéma de 3 voies métaboliques de la méthanogénèse : à partir du CO ₂ (A), de l'acétate (B) et du méthanol (C). Abréviations : CHO-FMR, N-formylmethanofuran ; CHO-H4MPT, N5-formyltetrahydromethanopterin ; CH=H4MPT, N5-N10methyl-tetrahydromethanopterin ; CH=H ₄ MPT, N ⁵ -N ¹⁰ methyl-tetrahydromethanopterin. (D'après Hedderich, 2006).	79
Figure 34: Représentation schématique de la 4ème voie de la méthanogénèse découvertes chez les membres de l'ordre des <i>Methanomassiliicoccales</i> . Les flèches noires indiquent les réactions enzymatiques présentes dans les génomes des <i>Methanomassiliicoccales</i> ; les flèches bleues indiquent les réactions enzymatiques présentes dans les génomes des <i>Methanomassiliicoccales</i> ; les flèches rouges indiquent la réaction proposée entre l'hétérodisulfure réductase (HdrD) et le complexe « Fpo-like » pour la régénération du Coenzyme B-SH. Les flèches Bleu-vertes indiquent que les enzymes ne sont pas présentes dans les génomes étudiés. Point bleu <i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> ; vert <i>Methanomassiliicoccus intestinalis</i> ; rouge <i>Methanomethylophilus alvus</i> (d'après (Lang et al., 2015).	79
Figure 35: Parties oxydative et réductive de la méthanogénèse.	80
Figure 36: Représentation schématique de la chaîne respiratoire catalysant la réduction du CoM-S-S-CoB en présence d'hydrogène et de la methanophenazine chez les espèces du genre <i>Methanosarcina</i> . (D'après Hedderich, 2006).....	81
Figure 37: Schéma pour la réduction du CoM-S-S-CoB avec l'hydrogène en présence du complexe hydrogénase (MvhADG)-hétérodisulfure réductase (HdrABC). Ce complexe enzymatique couplerait la réduction endergonique de la ferrédoxine avec l'H ₂ et la réduction exergonique du CoM-S-S-CoB avec l'H ₂ par bifurcation d'électrons dans le co-facteur FAD. (D'après Thauer, 2008).	82
Figure 38: Réaction, Coenzymes et enzymes nécessaires à la réduction du CO ₂ avec 4 H ₂ pour former du CH ₄ chez <i>M. marburgensis</i> . La ferrédoxine réduite qui est nécessaire à la réduction du CO ₂ en formylmethanofuran (CHO-MFR) est régénérée par la réaction catalysée par le complexe MvhADG/HdrABC. (Kaster et al., 2011).	83
Figure 39: A) voie de fixation du CO ₂ chez les méthanogènes de classe I et II en l'absence de cytochromes. B) Voie de la réduction des composés méthylés chez les <i>Methanomassiliicoccales</i> , les parties grisées sont absentes dans cet ordre. (D'après Borrel, 2016).	84
Figure 40: Voie de la méthanogénèse et conservation de l'énergie chez les représentants des <i>Methanomassiliicoccales</i> . En gras, le nom des protéines. En bleu, l'ensemble des voies et enzymes présentes chez les 3 génomes des <i>Methanomassiliicoccales</i> , en vert absent chez <i>M. intestinalis</i> , en rouge absent chez <i>M. alvus</i> . (D'après Borrel, 2014).	85

Figure 41: Position phylogénétique des espèces du genre <i>Methanohalophilus</i> basée sur les séquences d'ARNr 16S. (D'après Katayama, 2014).	88
Figure 42: Arbre phylogénétique du vivant basé sur l'analyse des gènes ADNr 16S et 18S. Les triangles verts indiquent les phyla avec au moins un représentant cultivé, les triangles rouges les phyla sans représentant cultivé. D'après Lopez-Garcia and Moreira, 2008.	90
Figure 43: (A) Evolution du nombre de phyla ne comportant pas de représentant cultivé chez les <i>Bacteria</i> en bleu et les <i>Archaea</i> en rouge entre 1997 et 2007. Le chiffre n correspond au nombre de phyla identifiés. (B) Représentation des méthodes culturales mises en œuvre pour augmenter la part de microorganismes cultivés. D'après la thèse de F. Gaboyer, modifié d'après Achtman & Wagner, 2008 ; Alain & Querellou, 2009.	91
Figure 44: Principe du « Single Cell Genomics ». Après conditionnement des cellules extraites d'un échantillon environnemental, les cellules sont isolées individuellement dans les puits d'une plaque. L'ADN cellulaire est amplifié par MDA (Multiple Displacement Amplification) après lyse cellulaire. La phylogénie des cellules isolées est déterminée par analyse de l'ADNr 16S. Différentes analyses (séquençage, criblage) peuvent alors être effectuées sur l'ADN génomique amplifié.	94
Figure 45: A gauche le navire de recherche Italien URANIA, à droite le carrousel avec les 24 bouteilles NISKIN et la sonde CTD située dans la partie basse.	99
Figure 46: Représentation schématique de la microplaque 96 puits pour le dénombrement des cellules cultivables. Les lignes grisées correspondent aux puits non inoculés. Chaque échantillon est inoculé en cascade de dilution en duplicat.	108
Figure 47: Schéma du système de culture haute-pression HPHT (Top Industries, France).	114
Figure 48: Principe du séquençage par la méthode « PacBio » (Goodwin et al., 2016).	127
Figure 49: Principe du séquençage par la méthode de l'Ion Torrent (Goodwin et al., 2016).	127
Figure 50: Représentation de la méthode « Mat-pair » pour le séquençage.	128
Figure 51: Photographie en microscopie à contraste de phase, objectif X100, de l'enrichissement 22.8. Les cellules présentent un renflement.	135
Figure 52: Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode du maximum de vraisemblance basé sur l'analyse du gène codant pour la petite sous-unité 16 du ribosome (ARNr 16S). La position de la séquence correspond à la souche « Strain SL1 MAMBA1 » est soulignée en rouge. L'échelle correspond à 5% de divergence dans la séquence nucléique.	136
Figure 53: Arbre phylogénétique réalisé à partir de l'ADNr 16S de l'isolat SLHKRYOS 23.9 (ici noté Stéphane).	138
Figure 54: Observation des colonies obtenues en cultivant la souche méthanogène SLHKRYOS dans les flacons de Wolfe après deux mois d'incubation (flèches rouges).	145
Figure 55: Photographie en microscopie à contraste de phase de la souche SLHTYRO (A) et SLHKRYOS (B). Les cellules ont été observées au grossissement X100.	146
Figure 56: Photographie en microscopie électronique à transmission (MET) de la souche SLHTYRO (A) et SLHKRYOS (B). La barre en bas à droite correspond à l'échelle de 500 nm.	146
Figure 57: Courbe de croissance des souches SLHTYRO et SLHKRYOS en fonction de la température. D0 : densité optique mesurée à 600 nm.	147
Figure 58: Gamme de croissance en fonction de la salinité (concentration en NaCl en g/L ⁻¹) des souches SLHTYRO et SLHKRYOS. DO : Densité optique mesurée à 600 nm.	147
Figure 59: Schéma représentant les sources de triméthylamine et des composés méthylés.	150
Figure 60: Densités cellulaires (en nombre de cellule x 10 ⁷ par ml) des souches SLHTYRO et SLHKRYOS en fonction de la pression hydrostatique en MPa (MegaPascal= 10 ⁶ Pascal). Le point 0,1 MPa correspond à une fiole préparée de la même façon que celles incubées sous pression hydrostatique et incubée dans une étuve sans pression hydrostatique. Inoc : Indique le nombre de cellules au début de l'expérience dans les flacons. Les barres verticales correspondent à l'écart type par rapport à une moyenne d'effectifs cellulaires obtenue à partir de triplicat de culture.	153
Figure 61: Densités cellulaires (en nombre de cellule x 10 ⁷ par ml) des souches des espèces <i>M. portucalensis</i> (MP), <i>M. mahii</i> (MM) et <i>M. halophilus</i> (MH) en fonction de la pression hydrostatique (en MPa= 10 ⁶ Pa). Le point 0,1 MPa correspond à une fiole préparée de la même façon que celles incubées sous pression hydrostatique et incubée dans une étuve sans pression hydrostatique. TO : Indique le nombre de cellules au début de l'expérience dans les flacons.	154
Figure 62: Densités cellulaires (en nombre de cellule x 10 ⁷ par ml) des souches RSE et RSK en fonction de la pression hydrostatique en MPa (=10 ⁶ Pa). Le point 0,1 MPa correspond à une fiole préparée de la même	

façon que celles incubées sous pression hydrostatique et incubée dans une étuve sans pression hydrostatique. Le point gaz phase correspond à une fiole contenant une phase de gaz dans la fiole, condition classique de croissance d'un microorganisme en anaérobiose. TO : Indique le nombre de cellules au début de l'expérience dans les flacons.	155
Figure 63: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse de l'ADNr 16S montrant la position phylogénétique des souches M. SLHTYRO, M. SLHKRYOS et M. SLHTHETIS calculé selon la méthode de distance (Neighbor joining). La séquence du gène codant l'ARNr 16S de <i>Methanopyrus kandleri</i> est utilisée comme groupe externe pour raciner l'arbre. Les valeurs en pourcentage au niveau des nœuds indiquent la robustesse des topologies d'arbre calculées à partir de 1000 ré-échantillonnages. La barre représente 5 substitutions pour 100 nucléotides.....	157
Figure 64: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'acides aminés de la protéine McrA montrant la position des souches M. SLHTYRO, M. SLHKRYOS et M. SLHTHETIS calculé selon la méthode du maximum de vraisemblance. La séquence de la protéine McrA de <i>Methanopyrus kandleri</i> est utilisée comme groupe externe pour raciner l'arbre. Les valeurs en pourcentage au niveau des nœuds indiquent la robustesse des topologies d'arbre calculées à partir de 1000 ré-échantillonnages. La barre représente 5% de divergence dans les séquences d'acides aminés.	158
Figure 65: Représentation graphique de l'évolution de la concentration cellulaire en fonction de la salinité du bassin (‰).	161
Figure 66: Gel électrophorétique de vérification de l'amplification par PCR dite « nichée » réalisée avec les couples d'amorces Saf1-GC/ Saf2-GC et 519R pour l'analyse des communautés Archaea en DGGE. M : marqueur de poids moléculaire (1 Kb, Promega). C+b : témoin positif bactérien; C ⁺ a : témoin positif archaéen; échantillon à 46 ; 180, 210 et 303 g.L ⁻¹ de sels. Chaque dépôt des produits de PCR « nichée » est de 5 µL. Les bandes positives visibles sur le gel électrophorétique ont une taille attendue d'environ 200 pb.	162
Figure 67: Profils électrophorétique de PCR-DGGE pour les <i>Archaea</i> (gradient 30% à 60%) et pour les <i>Bacteria</i> (gradient 20-50%) en fonction du gradient de salinité du bassin hypersalé profond anoxique Tyro. Chaque dépôt des produits de PCR-DGGE est de 15 µL sur un gel d'acrylamide à 8%.	163
Figure 68 : Gel électrophorétique de vérification des amplifications par RT-PCR à partir des matrices d'ARN totaux correspondant aux ARNr 16S et ARNm du gène mcrA de la souche SLHTYRO placée dans un milieu contenant 300 g.L ⁻¹ de NaCl. Les ARNs ont été rétro-transcrits à l'aide d'amorces spécifiques de l'ADNr 16S et du gène <i>mcrA</i> , puis amplifiés par PCR. M : marqueur de taille (1 kb ladder, Promega). 1 : 0 jour ; 2 : 1 jour ; 3 : 7 jours ; 4 : 15 jours ; 5 : 30 jours ; 6 : 45 jours. + : contrôle positif. Chaque dépôt des produits de RT-PCR est de 5 µL. Les bandes positives visibles sur le gel électrophorétique ont une taille attendue de 1500 pb et 800 pb pour l'ARNr 16S et le mcrA respectivement.	168
Figure 69: Schéma proposant le fonctionnement des DHABS. A : Localisation des DHABS en Mer Méditerranée. B : Schéma d'un bassin indiquant la présence des cristaux de sels et de la présence probable d'espèces marines mortes sous les croûtes de sels. La présence d'hydrocarbure dans les sédiments est également proposée. C : Représentation synthétique des processus métaboliques microbiens impliquant les microorganismes cultivés de ces bassins (ce travail) et conduire à laproduction de méthane biogénique. L'hypothèse de la bétaine comme précurseur principale des composés méthylés est proposée.	197

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimiques et autres propriétés des différentes saumures.	46
Tableau 2: Synthèse des activités métaboliques mesurées dans différents DHABs (d'après Daffonchio, 2006).	52
Tableau 3: Liste des bassins échantillonnés au cours des différentes campagnes océanographiques.	99
Tableau 4: Liste des échantillons qui ont été utilisés pour les enrichissements dans des milieux de cultures composés de trois salinités différentes et le code attribué.	103
Tableau 5: Synthèse des enrichissements positifs obtenus en fonction de la salinité et de la source de carbone ajoutée dans le milieu. Dans la première colonne est listé le code de chaque échantillon, le premier chiffre après le nom du bassin correspond au code attribué en fonction de la salinité d'origine de l'échantillon. (cf. matériel et méthode). Le deuxième chiffre indique à partir de quel milieu a été réalisé l'enrichissement. Dans la colonne 2 sont décrites les salinités des échantillons. La colonne 3 correspond aux milieux de culture utilisés et la nature des métabolismes recherchés avec un code milieu suivant : 1 –autotrophe nitrate ; 2- autotrophe soufre/thiosulfate ; 3- autotrophe fer ; 4- acétate ; 5- Triméthylamine (TMA), 6- lactate/acétate ; 7- benzoate/propionate ; 8- hétérotrophe, 9- choline ; 10- dextran ; 11- bétaine. Exemple : Tyro 2.4 : provient de l'échantillon initial à une salinité de 16% (Niskin #11 ; tableau matériel et méthode) et enrichie sur le milieu n°4(acétate). Dans les colonnes 4,5 et 6 sont décrits, respectivement, les temps d'incubation des cultures d'enrichissement, la morphologie des microorganismes enrichis et le pourcentage d'identité de la séquence de l'ADNr 16S avec la souche cultivée la plus proche.	133
Tableau 6: Dénombrement des populations microbiennes cultivables dans un milieu de culture destiné à enrichir des microorganismes hétérotrophes aérobies pour trois conditions de salinités à partir d'échantillons de saumures collectés en Mer Méditerranée (Medee, Tyro, Thetis et Urania) par la technique du nombre le plus probable (NPP). Entre parenthèse sont indiquées les concentrations en NaCl (en g.L ⁻¹).	140
Tableau 7: Nombre de puits montrant une croissance cellulaire dans le milieu de culture destiné à enrichir des microorganismes hétérotrophes aérobies dans trois conditions de salinité. Entre parenthèse sont indiquées les concentrations en NaCl (g.L ⁻¹). Au total 88 puits sont inoculés et une colonne (8 puits) est un témoin de non contamination de la plaque 96 puits.	140
Tableau 8: Affiliation taxonomique des séquences d'ADNr 16S obtenues à partir des puits de cultures positives obtenues en plaques 96 puits par l'approche haut-débit à l'aide de l'outil BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Le niveau taxonomique retenu pour les résultats de BLAST est celui du genre. Le milieu de culture utilisé est spécifique des bactéries hétérotrophes aérobies et pour trois conditions de salinité (NaCl en g.L ⁻¹) réalisées en parallèle. Les chiffres correspondent au nombre de séquences obtenues classées dans les groupes taxonomiques correspondant.	142
Tableau 9: Comparaison des conditions physiologiques (température, salinité et pH) de croissance des souches du genre <i>Methanohalophilus</i> isolées dans cette étude à partir des bassins profonds hypersalés de Mer Méditerranée avec les représentants <i>Methanohalophilus</i> présentes dans les collections internationales.	148
Tableau 10: Concentrations des composés aminés et méthylés dans les eaux des bassins hypersalés profonds anoxiques Tyro et Kryos en micro- et millimolaires. MMA : Monométhylamine, DMA : Diméthylamine, TMA : Triméthylamine.	151
Tableau 11: Matrice de similarité exprimée en pourcentage lorsque l'on compare des séquences de l'ADNr 16S des 5 souches appartenant au genre <i>Methanohalophilus</i>	158
Tableau 12: Identités des communautés <i>Archaea</i> métaboliquement « actives » dans le bassin Tyro. Le pourcentage d'identité des séquences analysées représente le niveau de similarité entre les séquences des gènes ADNr 16S (ADNr 16S codant) et celles présentes dans la banque de données internationales (NCBI). Le pourcentage de séquences identifiées est calculé par rapport au nombre total de clones séquencés.	163
Tableau 13: Identités des communautés <i>Bacteria</i> métaboliquement « actives » dans le bassin Tyro. Le pourcentage de similarité représente le niveau de ressemblance entre les séquences des gènes ADNr 16S de notre étude et celles présentes dans la banque de données internationales (GenBank). Le pourcentage de séquences identifiées est calculé par rapport au nombre total de clones séquencés. ..	165
Tableau 14 : Caractéristiques principales des génomes de <i>M. SLHTYRO</i> , <i>M. SLHKRYOS</i> et <i>M. SLHTHETIS</i> . .	185
Tableau 15: Caractéristiques principales des génomes de <i>M. mahii</i> , <i>M. halophilus</i> et <i>M. portucalensis</i>	186
Tableau 16: Valeurs d'identités nucléotidiques (ANI) pour les souches du genre <i>Methanohalophilus</i>	187

Abréviations

ABC : ATP Binding Cassette

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomal

ANI : Average Nucleotides Identity

APS : PerSulfate d'Ammonium

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal

ARNr 16S : petite sous-unité 16S du ribosome

ATP : Adénosine Tri Phosphate

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BlastN : Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide

BSR : Bactérie sulfato-réductrice

Cas : CRISPR-associated

CDS : Coding DNA Sequence

CFB : *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes*

COG : Cluster of Orthologous Gene

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DDH : DNA/DNA Hybridization

ddNTP : Didésoxyribonucléotide Triphosphate

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DHAB : Deep Hypersaline Anoxic Basin

DMA : DiMéthylAmine

dNTP : Désoxyribonucléotide Triphospahte

DSM : Deutsche SammLung Medium

DSMZ : Deutsche SammLung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic acid

FISH : Fluorescence *in situ* hybridisation

GGDC : Genome to Genome Distance Calculator

HPH : Haute Pression Hydrostatique

HPHT : Haute Pression Haute Température

MMA : MonoMéthylAmine

MaGe : Magnifying Genomes

MES : 2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic acid

PIPES : Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

MET : Microscopie Electronique à Transmission

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

MPa : MégaPascals

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ng : Nanogramme

NGS : Nouvelles Générations de Séquençages

nm : Nanomètre

NPP : Nombre le Plus Probable

OTU : Operational Taxonomic Unit

PacBio : Pacific Bioscience

Pb : Paire de bases

PCI : Phénol Chlorophorme alcool Isoamylique

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGAP : NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline

PhyML : Phylogeny based on Maximum-Likelihood

RAST : Rapid Annotation using Subsystem Technology

RLU : Relative Luminescence Unit

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Rpm : Rotation par minute

SCG : Single Cell Genomic

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SMRT : Single Molecule Real-Time analysis

SNP : Single-Nucleotide Polymorphism

TAE : Tris-Acétate-EDTA **Taq** : *Thermophilus aquaticus*

TEMED : N, N, N', N'-Tétraméthyléthylène diamine

Tm : Temperature of melting

TMA : TriMéthylAmine

TMAO : TriMethylAmine N-Oxyde

TNE : Tris-NaCl-EDTA

UV : Ultra Violet

μL : Microlitre

μM : Micromolaire

UV : Ultra-Violet

V : Volt

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

I. Les environnements extrêmes

Un environnement est considéré comme extrême s'il est hostile au développement de la plupart des organismes vivants et représente donc un défi pour la survie des espèces dans ces conditions. Différents paramètres physico-chimiques tels que la température (très élevée ou très basse), le pH (ex : très acide ou alcalin), la pression hydrostatique, la quantité et la qualité du carbone disponible (milieu oligotrophe), la salinité, les radiations, la concentration en métaux, l'anoxie, la disponibilité de l'eau sont autant de facteurs qui seuls ou associés définissent les environnements extrêmes. En raison de propriétés extraordinaires, certains organismes vont être capables de se développer dans ces habitats extrêmes et sont définies comme extrêmophiles. Les organismes extrêmophiles sont représentés dans les trois domaines du vivant : *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*. Il a longtemps été considéré que les microorganismes extrêmophiles appartenaient au domaine des *Archaea*. Il est vrai que les premiers microorganismes cultivés appartenant au domaine des *Archaea* étaient des extrêmophiles, cependant des microorganismes appartenant aussi aux domaines *Bacteria* et *Eucarya* croissent à des températures élevées (95°C pour une bactérie du genre *Aquifex*, 62°C pour un organisme unicellulaire eucaryote (Tansey and Brock, 1972) ou à des salinités importantes telle que la bactérie halophile extrême *Salinibacter ruber* ou l'algue verte *Dunaliella* et sont donc des organismes extrêmophiles (figure 1).

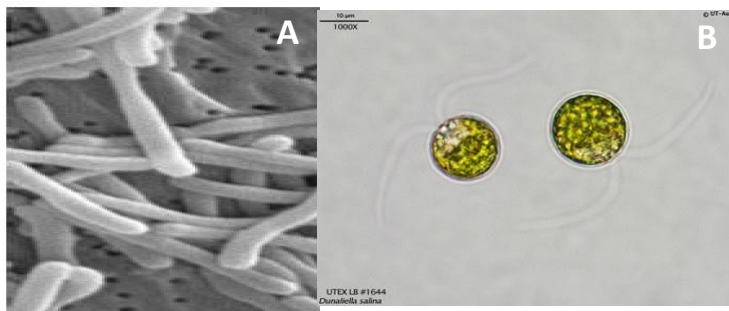


Figure 1: A) Photomicrographie en microscopie électronique à balayage de l'espèce *Salinibacter ruber* (échelle 2,5 µm). B) Photomicrographie au microscope à contraste de phase de *Dunaliella salina* (échelle 10 µm).

Les environnements extrêmes ont fasciné depuis longtemps les microbiologistes. Le premier livre dédié aux microorganismes extrémophiles fut publié en 1979 (Schwartz, 1979). Dans ce livre il a été montré l'intérêt des microbiologistes pour ces microorganismes qui vivent dans des habitats longtemps considérés comme incompatibles avec toute forme de vie et les problèmes purement techniques liés à leurs études au laboratoire. L'étude de ces microorganismes, dont les conditions de croissance sont très éloignées des conditions de croissance utilisées couramment dans les laboratoires, demandent des développements et des outils spécifiques (ex : incubateur haute-température, haute-pression, anoxie, etc...).

Depuis la naissance de notre planète Terre, les environnements extrêmes ont existé sur Terre. L'activité des plaques tectoniques résulte en la naissance de dorsales médio-océaniques, de montagnes, de failles, de volcans et autres phénomènes géothermiques tels que les sources hydrothermales océaniques. Ces manifestations tectoniques produisent des remontées de fluides très chauds acides, contenant des gaz et des métaux dissous créant des environnements extrêmes où des microorganismes se développent. L'étude de la vie microbienne à haute température a connu un grand élan grâce aux travaux de Thomas Brock et de ses collaborateurs dans les années 1960 au niveau des sources thermales du parc national de Yellowstone aux Etats Unis (Brock et al., 1978, figure 2). Ces travaux ont permis de reculer les températures limites de la vie. A ce jour, la température record de croissance sous pression hydrostatique (122°C, 20 MPa) est détenue par une *Archaea* méthanogène autotrophe hyperthermophile, *Methanopyrus kandleri* souche 116, isolée d'une source hydrothermale océanique (Takai et al., 2008, figure 2).

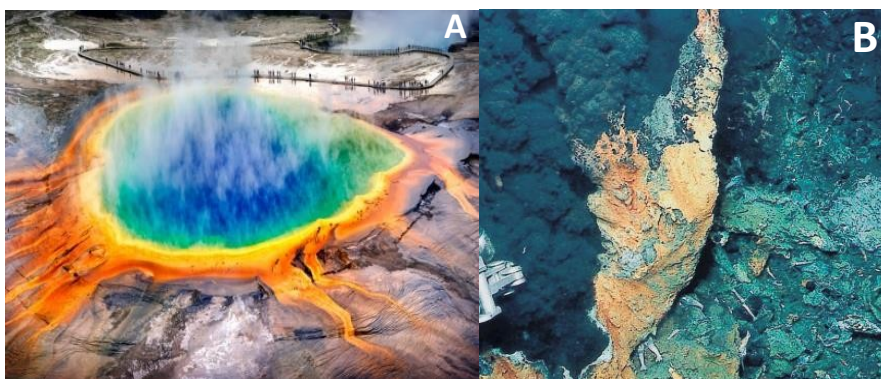


Figure 2: A) Source chaude du Parc de Yellowstone (USA). B) Cheminée hydrothermale observée dans l'Océan Indien (champ Kairei).

Les océans couvrent 75% de notre planète et une partie de la surface de la planète est recouverte par de l'eau sous forme solide, la cryosphère (glacier, permafrost, champ de neige, ...). La dynamique du climat et de la cryosphère influencent les précipitations, l'hydrologie et la circulation des courants dans les océans. Dans les régions où les précipitations sont très faibles, des déserts se développent. De la même manière, les lacs hypersalés apparaissent dans des bassins endoréiques où le drainage est très faible. L'aptitude des microorganismes à se développer dans des environnements hypersalés a été révélée depuis longtemps. Charles Darwin, dans ses fameux rapports sur ses voyages sur le H.M.S Beagle (1939) décrivait le lac hypersalé de Patagonie et la couleur rouge qui apparaissait à certains endroits du lac. Dès le début du 20^{ème} siècle, les microorganismes responsables de cette couleur rouge ont été isolés. Ce sont des microorganismes halophiles extrêmes appartenant à la famille des *Halobacteriaceae* affiliées au domaine des *Archaea*.

La profondeur moyenne de l'océan est de 3800 m ce qui équivaut à une pression hydrostatique de 38 MPa (380 bars). La pression hydrostatique augmente de 10 MPa tous les Kms dans la colonne d'eau. Il en découle que 88% du volume de l'océan est soumis à de fortes pressions hydrostatiques. Le site le plus profond dans l'océan est localisé au niveau de la fosse des Mariannes (10998 m) avec des pressions hydrostatiques qui atteignent 110 MPa. *Colwellia sp.*, souche MT41, a été la première souche piezophile obligatoire isolée de ce site. La souche MT41 croît de façon optimale à une pression hydrostatique de 69 MPa (Yayanos et al., 1981).

On désigne aujourd'hui par le terme « piezophile » l'ensemble des organismes capables de se développer sous forte pression hydrostatique, par « piezophile stricte » les microorganismes qui ont besoin d'une pression hydrostatique minimale pour se développer; par « piezosensible » les organismes qui ne se développent pas sous pression hydrostatique et par « piezotolérant » les organismes qui peuvent croître sous pression sans que leur taux de croissance ne soit amélioré (figure 3).

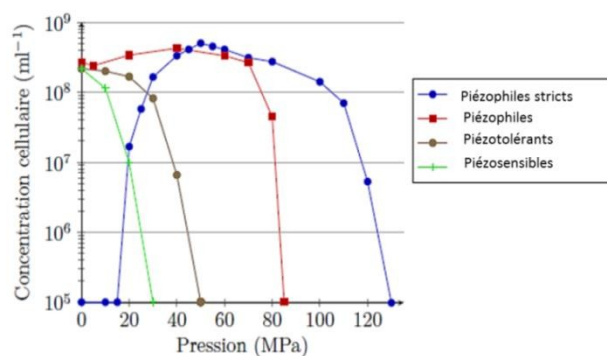


Figure 3: Représentation de la croissance microbienne en fonction de la pression hydrostatique.

Depuis les travaux pionniers de Zobell, Morita et Jannasch sur l'étude des microorganismes pouvant croître sous pression hydrostatique, une cinquantaine d'espèces piezophiles ou piezotolérantes du domaine *Archaea* ou *Bacteria* ont été isolées des environnements marins profonds (Jebbar et al., 2015). Connaissant l'immensité du réservoir que constitue l'océan et la biosphère sous-terrine, la diversité des microorganismes peuplant la biosphère profonde, avec ce faible nombre de souches isolées, est loin d'être couverte. L'étude des microorganismes piezophiles souffre essentiellement du manque d'outils permettant d'une part les prélèvements sous pression hydrostatique et les cultures de ces microorganismes en conditions « *in-situ* ». De plus, à l'heure actuelle, très peu de laboratoires possèdent les équipements permettant les cultures d'organismes sous forte pression hydrostatique (Jebbar et al., 2016).

L'intérêt porté par les microbiologistes à l'étude des microorganismes se développant dans ces environnements extrêmes n'a fait que croître ces trois dernières décennies. De plus en plus d'environnements qui étaient encore inaccessibles pour des raisons de limites techniques (biosphère souterraine, ..) peuvent aujourd'hui être explorés et échantillonnés. L'utilisation et l'essor de nouvelles technologies regroupées sous le terme de « Omics » (métagénomique, metatranscriptomique et métabolomique) ont permis de mesurer la richesse de la diversité microbienne inféodée à ces écosystèmes. Ces études révèlent comment la vie fonctionne dans ces écosystèmes extrêmes, mais nous enseigne aussi sur la nature de la vie elle-même et sur les propriétés éventuelles des premiers organismes qui ont colonisé notre planète. Une question très pertinente sur l'étude des organismes extrémophiles est de savoir si ces organismes se sont adaptés récemment à ses environnements extraordinaires ou si ces organismes sont des vestiges

d'anciens types d'organismes qui auraient évolué depuis la terre primitive. L'évidence d'une activité microbienne dans des temps très anciens est révélée dans les roches terrestres. Ainsi l'existence et la signature biotique du méthane piégé dans des cristaux datées à 3,46 Milliards d'années nous indiquent la présence de microorganismes méthanogènes (Ueno et al., 2006). L'étude des extrémophiles a donc d'importantes implications sur notre connaissance de l'origine de la vie. De plus, définir les limites de la vie sur notre planète, donc les limites des microorganismes extrémophiles, peut apporter des preuves sur la possibilité de l'existence, actuelle ou passée, de vie similaire dans l'univers. D'un point de vue biotechnologique, les microorganismes extrémophiles peuvent être exploités à des fins économiques. On citera par exemple les enzymes thermostables des organismes thermophiles, le pouvoir chélatant des organismes acidophiles vis à vis des métaux, et les enzymes issues des microorganismes alcaliphiles, utilisées dans les lessives.

II. Les environnements hypersalés.

II.1. Introduction

Les environnements hypersalés sont largement distribués sur Terre. Ils se forment facilement dans des bassins et des lagunes où l'eau de mer qui contient 35 g.L^{-1} de sels dissous est soumise à une forte évaporation. Il existe des lacs hypersalés que l'on retrouve à l'intérieur des terres dont la concentration en sels est proche de la saturation. On citera par exemple, le Grand Lac Salé en Utah (USA) et la Mer Morte bordant Israël et la Jordanie dans lesquels les concentrations en sels atteignent 270 g.L^{-1} et 330 g.L^{-1} de sels respectivement. Les environnements hypersalés sont aussi créés artificiellement par l'homme (ex : salines, lac, ...). Dans le cas des marais salants, les différents bassins successifs permettent d'augmenter la concentration en sel. Ces derniers vont cristalliser et ainsi permettre leur récolte et leur exploitation économique.



Figure 4: Marais salant de Eilat, Israël. La couleur rouge est observée dans les bassins

Les environnements hypersalés peuvent être classés en deux catégories : thalassique et athalassique. Les bassins thalassiques sont créés par évaporation de l'eau de mer, les ions sodium et chlorure dominant. Les bassins athalassiques sont caractérisés par de fortes concentrations en ions divalents, dont le magnésium et le calcium qui sont les cations majoritaires. Un parfait exemple de bassin athalassique est la Mer Morte. La concentration en sels est de 330 g/l, principalement des cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} avec des concentrations proches de 2 M et de 0,47 M respectivement.

II.2. Classification des microorganismes halophiles.

Les microorganismes qui habitent ces environnements hypersalés sont désignés comme halophiles. Ce sont des organismes extrêmophiles qui doivent non seulement lutter contre la forte concentration ionique du milieu mais aussi contre des pH alcalins, des teneurs faibles en oxygène, des températures basses ou élevées, la présence de métaux lourds ou de composés toxiques. La classification la plus largement acceptée des microorganismes halophiles a été proposée par Kushner and Kamekura (1988). Cette classification est basée sur la concentration de chlorure de sodium (NaCl) permettant une croissance optimale des microorganismes. En effet les microorganismes halophiles sont classés en trois catégories : les halophiles extrêmes qui croissent de façon optimale à des concentrations en sels supérieures à 15%, les halophiles modérés qui se développent de façon optimale entre 3 et 15% et les halophiles légers ou halotolérants qui sont représentés par la plupart des microorganismes marins et qui croissent à des concentrations en sels comprises entre 1 et 3%. Les microorganismes non halophiles sont les microorganismes qui nécessitent moins de 1% de NaCl pour se développer. Cependant certains d'entre eux peuvent tolérer de fortes concentrations en sels et sont considérés comme halotolérants.

II.3. Taxonomie des microorganismes halophiles.

D'une manière générale pendant longtemps, les microorganismes halophiles des environnements hypersalés ont été répartis en deux groupes physiologiques : les microorganismes aérobies halophiles extrêmes appartenant au domaine des *Archaea* (*Haloarchaea*) et les bactéries halophiles modérées. Les *Archaea* halophiles sont regroupés dans le phylum des *Euryarchaeota*, et la plupart appartiennent à la classe des *Halobacteria* (Cavalier-Smith, 2002). Cependant des méthanogènes halophiles ont été isolées de ces environnements (Zhilina, 1983; Boone et al., 1993; Paterek and Smith, 1988). Au cours des deux dernières décennies, des études utilisant des méthodes culturales à partir d'échantillons collectés dans différents habitats hypersalés ont permis d'isoler un grand nombre d'espèces, voire de genres ou de taxons supérieurs et de révéler une grande diversité métabolique et physiologique. Ces études ont démontré que les *Archaea* halophiles n'appartiennent pas exclusivement aux *Haloarchaea* et que toutes les *Haloarchaea* ne sont pas des halophiles extrêmes. De la même manière chez les *Bacteria*, les microorganismes halophiles sont présents dans plusieurs branches phylogénétiques, reflétant ainsi la diversité métabolique des espèces halophiles, et sont généralement classés comme halophiles modérés ou légers. Cette très forte diversité physiologique comprend des microorganismes hétérotrophes aérobies et anaérobies, des bactéries sulfato-réductrices, des microorganismes fermentaires (figure 5). Récemment, une bactérie halophile extrême *Salinibacter ruber* (Anton et al., 2002) a été décrite et mise en évidence dans de nombreux habitats hypersalés et constitue, dans ces environnements proches de la saturation, la bactérie la plus abondante avec l'haloarchaeon *Haloquadratum walsbyi* (Burns et al., 2007).

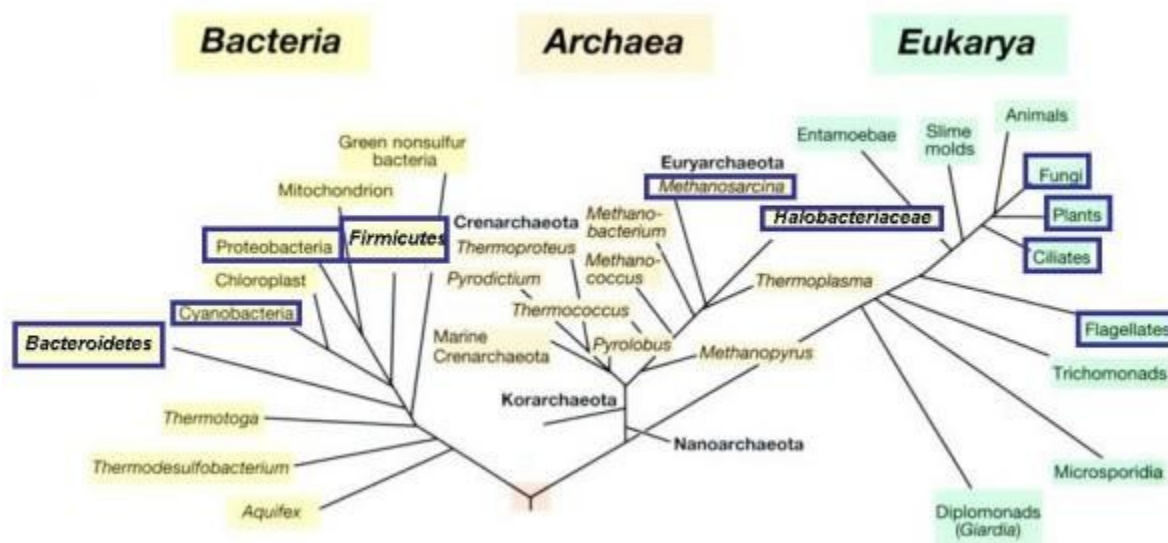


Figure 5: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S. Les rectangles bleus indiquent la présence d'au moins un microorganisme halophile dans le groupe.

II.4. Distribution et datation des dépôts de sels anciens.

A plusieurs périodes de l'histoire de notre planète, de fortes sédimentations d'halite (NaCl) et d'autres minéraux provenant de mers hypersalées ont eu lieu. Les dépôts de sels au cours de la période géologique allant de la fin du Permien et du début du Triassic (entre 245 et 280 millions d'années) sont estimés à 1,3 millions de km³ (Zharkov and *I*Anshin, 1981). Ces dépôts de sels peuvent atteindre une épaisseur de 1200 m, et sont retrouvés aujourd'hui dans les régions au nord du continent américain (Canada (Mackenzie basin), d'Europe du Nord et Centrale (Zechstein series,...) et de sibérie Une colonne d'eau de mer de 1000 m produit par évaporation une couche d'évaporite d'environ 17 m d'épaisseur. L'ordre de précipitation des sels et l'épaisseur des évaporites produits sont : 0,1 m de CaCO₃, 0,6 m de CaSO₄, 13,3 m de NaCl et 3 m de KCl et de KMgCl₂ (Figure 6).

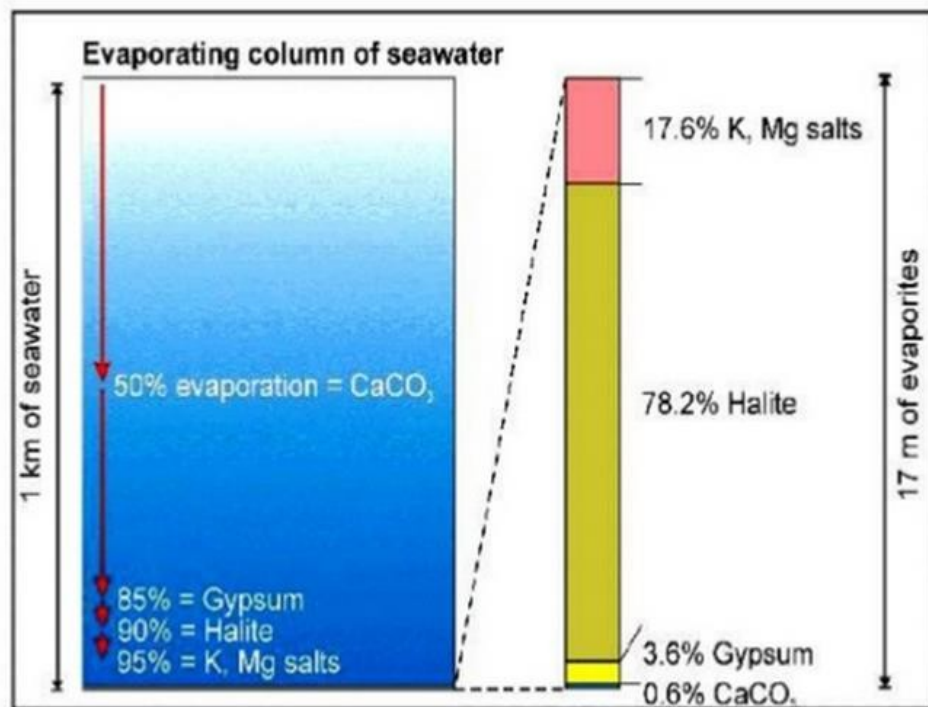


Figure 6: Représentation de l'évaporation totale d'une colonne d'eau de mer de 1000 m.

Dombrowski (1963) et Reiser and Tasch (1960) ont été les premiers à isoler et à décrire des microorganismes viables à partir de cristaux de sels. Les échantillons de Dombrowski provenaient d'échantillons de cristaux de sels collectés dans le dépôt du Zechstein situé en Allemagne du Nord et d'un autre d'origine Précambrienne de Sibérie. En utilisant un milieu de culture hypersalé, il isole deux souches ; un bâtonnet sporulant *Bacillus circulans* et un autre isolat appelé *Pseudomonas halocreneae*. Ce dernier se révéla plus tard être très proche de l'espèce *P. aeruginosa* et sera donc considéré comme un contaminant. De la même manière, Tasch et collaborateurs (Reiser et al., 1960; Tasch, 1963) ont décrit des diplocoques obtenus à partir de roches salées datant du Permien situées au Kansas. Bibo et ses collaborateurs (1983) ont isolé des microorganismes halophiles (bâtonnets et de coques) à partir d'échantillons de roches datant du Permien dans le bassin de Zechstein près de Fulda en Allemagne. Ces travaux n'indiquaient pas la présence de microorganismes pigmentés et donc la présence d'*Archaea* Halophiles. Cependant les travaux de Tasch (1963) et Nehrkorn (1961), qui reprirent les travaux de Dombrowski, décrivent la présence de microorganismes pigmentés. A partir de 1991, les

publications relatives à la viabilité des microorganismes dans les dépôts de sels mentionnent la présence d'isolats pigmentés (Vreeland et al., 1991; Norton et al., 1993 ;Denner et al., 1994). De ces travaux, il résulte que les *Haloarchaea* sont les microorganismes viables prédominants dans ces cristaux de sels. Cependant les conditions de cultures utilisées telles que l'aérobiose, l'hétérotrophie et un pH neutre, favorisent le développement des microorganismes à croissance rapide dont des représentants du genre *Haloarcula*. Grant et collaborateurs (1998) (Grant et al., 1998) ont utilisé une approche moléculaire basé sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S pour comparer les différentes séquences des souches du genre *Haloarcula* obtenues à partir de cristaux de sels de différents temps géologiques (65 et 240 millions d'années) et des souches isolées d'environnements hypersalés actuels. Les résultats attendus de l'analyse phylogénétique devaient démontrer que : 1) les souches appartenant au genre *Haloarcula* isolées des dépôts anciens auraient dû former des branches proches de la racine de l'arbre du vivant : 2) que les souches récentes forment des branches plus longues. Cette analyse n'a malheureusement pas pu démontrer de corrélation entre la position phylogénétique et l'âge géologique des échantillons analysés.

Halococcus salifodinae souche Blp a été isolée de cristaux de sels datant du Permien à partir d'échantillons situés en Autriche (Alpes) et a été décrite comme nouvelle espèce (Denner et al., 1994). Deux souches précédemment détectées ; la première souche Br3 isolée à partir de mine de sels de Cheshire en Angleterre par Grant et Norton (1988) (Norton and Grant, 1988) et la deuxième souche BG2/2 isolée par K.O. Stetter (1988) d'échantillon de mine de sels de Berchtesgaden en Allemagne, démontrent de nombreuses similitudes incluant notamment la morphologie des colonies, la séquence partielle d'ARNr 16S avec la souche Blp. Huit ans après l'isolement de la souche Blp, de nouveaux échantillons du même site ont permis l'isolement de plusieurs souches proches de *H. salifodinae* (Stan-Lotter et al., 1999). Une analyse détaillée de ces nouveaux isolats ainsi que des souches Br3 et BG2/2 précédemment isolées, incluant une analyse complète de la séquence du gène codant l'ARNr 16S, du contenu en G+C%, de la composition et de la relative abondance des lipides polaires, de la sensibilité aux antibiotiques et la spectroscopie infra-rouge à transformé de Fourier a été menée. Ces analyses ont conduit à la conclusion que tous ces isolats appartenaient à la même espèce, *H. salifodinae*. La présence de souches identiques entre les Alpes et les sédiments salés d'Angleterre peut s'expliquer par l'existence d'une mer hypersalée au Permien en Europe, mer hypersalée colonisée par une

communauté d'*Haloarchaea*. La formation d'évaporites aurait piégé ces microorganismes dans les cristaux de sels. L'espèce *H. salifodinae* n'a pour l'instant pas été mise en évidence au niveau des environnements hypersalés d'eau de surface. Il est tentant de spéculer que cette souche pourrait représenter un organisme marqueur de dépôts de sels anciens.

II.5 Survie des microorganismes halophiles.

De nombreux microorganismes halophiles, et spécifiquement les microorganismes appartenant à la famille des *Halobacteriaceae*, requièrent une concentration en sel élevée et stable pour maintenir leur intégrité structurale. En effet, à des concentrations en sels inférieures à 100 g.L⁻¹, les cellules lysent rapidement. C'est pourquoi des questions se posent quant à la distribution de ces microorganismes dans la nature et la colonisation de nouveaux environnements hypersalés. L'observation de cristaux d'halite montre que les populations denses des *Haloarchaea* présentes dans les saumures avant la précipitation des cristaux d'halite se retrouvent prises au piège dans les cristaux d'halite (Grant et al., 1998). Plus exactement, les cellules sont piégées dans des inclusions de fluide dans le cristal. Ces inclusions de fluide ont la composition chimique de la saumure au moment de la cristallisation et la taille et la forme des inclusions varient en fonction des types de cristaux. En ce qui concerne la question du temps de survie des cellules piégées dans les cristaux d'halite, des observations sur des cristaux d'halite anciennement formés provenant du Grand Lac Salé datant du Précambrien ont été analysés. Heinz Dombrowski en 1963 (Dombrowski, 1963) observa la présence de cellules intactes dans des cristaux d'halite formés à l'aire du Permien, c'est-à-dire il y a environ 250 millions d'années. A partir de ces cristaux, les auteurs ont enrichis et isolés des cellules en forme de coque de type à *Gram* positif et des cellules sporulantes en formes de bâtonnet. L'analyse du fluide d'inclusion étaye l'hypothèse que ces cristaux d'halite dateraient bien du permien (Satterfield et al., 2005). Ces résultats font cependant l'objet de nombreux débats dans la communauté et surtout de la part des biologistes. Les biologistes argumentent que l'ADN ne peut se conserver et rester intact sans un mécanisme de réparation (Hebsgaard et al., 2005). De plus, l'ADN d'une des souches isolées du Permien possède un ADN très proche d'une souche récemment cultivée *Virgibacillus marismortui*, et isolée de la Mer Morte (Arahal et al., 2000). Ceci suggère que cette bactérie datant du Permien serait plutôt un contaminant de laboratoire (Graur and Pupko, 2001). Cependant, les

évidences de la survie des microorganismes dans des cristaux de sels formés il y a des millions d'années sont mises en lumière (Vreeland et al., 2000; Vreeland, 2007).

Toutes les *Archaea* halophiles ne sont pas sensibles aux faibles concentrations en sels. Des souches proches du genre *Haloferax* ont été isolées dans des sédiments de l'estuaire de l'Essex au Royaume Uni où la salinité est proche de celle de l'eau de mer (Purdy et al., 2004). De même, des souches proches du genre Archéen *Halococcus* ont été isolées de la Mer Méditerranée loin des côtes (Rodriguez-Valera et al., 1979). Il est admis que la composition des fluides d'inclusions est complexe et variable, à l'exception des composés majeurs de la saumure originale (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , HCO_3^- , ...), ces fluides peuvent contenir des éléments traces (Fe, Br, Mn, Si, F), des métaux lourds et des composés organiques (Roedder, 1990), ce qui inclut par exemple des acides aminés et des hydrocarbures (Pironon et al., 1995). Ces hydrocarbures peuvent avoir différentes origines. Ils peuvent par exemple, provenir du méthane provenant du manteau terrestre ou d'une activité microbienne (Parnell et al., 2006b). La présence de méthane biogénique dans les fluides d'inclusions indique que des microorganismes méthanogènes ont pu être piégés dans les cristaux, ou qu'ils étaient présents et métaboliquement actifs dans la saumure avant la cristallisation (Parnell et al., 2006a).

Il n'y a aujourd'hui aucune méthode suffisamment sensible qui pourrait permettre de déterminer l'âge d'une cellule procaryote dont le contenu en carbone organique est d'environ 1 picogramme et comprenant plus de 300 molécules différentes. La plupart des scientifiques s'accordent à dire qu'il faut isoler un grand nombre de souches à partir de différents échantillons de cristaux de sels et de répéter l'expérience avant d'asseoir la certitude que les microorganismes isolés sont bien des cellules qui ont été piégées lors de la création des évaporites (Grant, 1998) et non de potentiels contaminants.

Notre connaissance des processus de survie des microorganismes dans les cristaux de sels est balbutiante. En particulier nous ne savons pas si les microorganismes ont besoin de maintenir une activité métabolique lorsqu'ils sont emprisonnés dans les cristaux de sels (figure 7). Dans ce cas, la présence de sources de carbone et d'énergie dans le fluide d'inclusion est d'une importance cruciale. La nature et la quantité des nutriments nécessaires pour soutenir la viabilité des microorganismes piégés dans les cristaux va dépendre aussi des mécanismes développés pour leur survie. Par exemple nous ne savons pas si les microorganismes doivent également

préserver l'intégrité de leurs ADN, ce qui nécessite des mécanismes peu coûteux en énergie, ou s'ils doivent réaliser des réactions métaboliques plus ou moins complexes et coûteuses. La diversité et la nature des processus métaboliques qui sont réalisés dans les cristaux de sels ne sont pas encore établies.

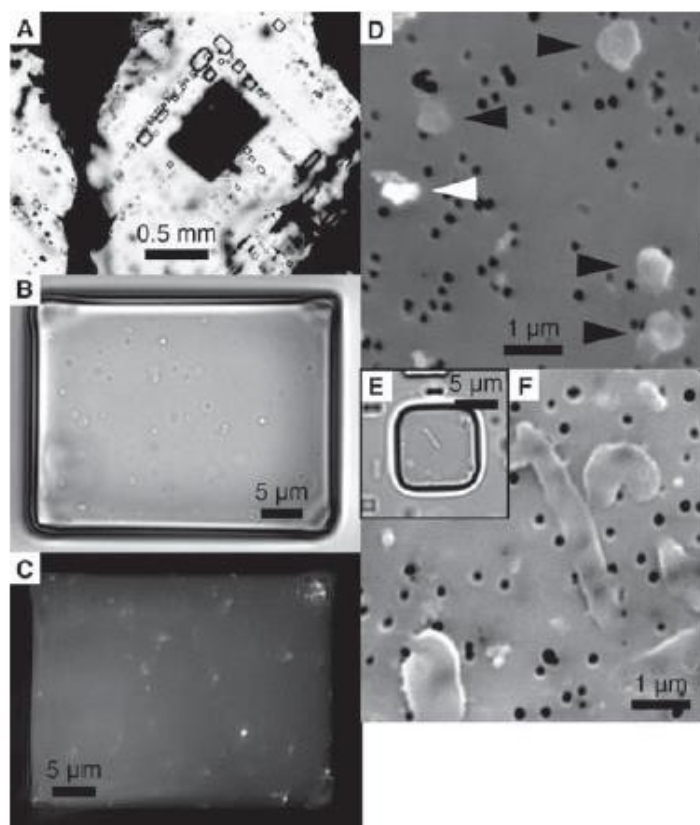


Figure 7: Photographie de fluide d'inclusion d'halite et de microorganismes. A, B, C microscopie optique ; D, E, F microscopie électronique à transmission. B, C, E les microorganismes sont visibles dans le cristal. (D'après Schubert et al., 2009).

II.6 Dispersion et distribution des microorganismes halophiles.

Des microorganismes halophiles affiliés au genre *Halococcus* ont été retrouvés dans les cavités nasales de l'oiseau marin *Calonectris diomedea* (Brito-Echeverria et al., 2009). Il a été suggéré que les oiseaux migrateurs pourraient être un vecteur de dispersion des microorganismes halophiles en transportant des cristaux des sels qui se seraient fixés sur leurs pattes. L'isolement d'une bactérie halophile extrême, *Bacillus dipsosauri*, des cavités nasales d'iguanes du désert

(Deutch, 1994) est un autre exemple de vectorisation et de dispersion des microorganismes halophiles par les animaux.

Il fût aussi démontré en 1985 par Wheeler et collaborateurs (Wheeler, 1985) que des cristaux d'halite provenant du désert Saharien pouvaient être transportés par le vent jusqu'en Angleterre.

II.7 Stratégie d'adaptation aux fortes pressions osmotiques.

Les microorganismes halophiles ont développé deux stratégies fondamentalement différentes pour vivre dans des conditions extrêmes de pression osmotique telles que celles rencontrées dans les environnements hypersalés. La première consiste à accumuler du sel à l'intérieur des cellules afin de maintenir une concentration très proche de la concentration en sel à l'extérieur de la cellule. La deuxième consiste à exclure les sels du cytoplasme et de contrebalancer la pression osmotique par la production et l'accumulation de solutés compatibles de nature organique à l'intérieur du cytoplasme.

La première stratégie dite «Salt-in» semble être limitée à quelques genres d'archées halophiles extrêmes (*Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Natronobacterium* et *Natronococcus*) et de bactéries halophiles extrêmes (*Salinibacter*, *Halanerobiales*). Dans cette stratégie des concentrations molaires de KCl sont maintenues à l'intérieur du cytoplasme. Par exemple, on considère que 5 M de potassium intracellulaire sont nécessaires pour contrebalancer une concentration de 4 M de sodium (Litchfield, 1998). Le mécanisme général par lequel sont expulsés les ions Na^+ et par lequel les ions K^+ pénètrent dans la cellule n'est pas très clair puisque les microorganismes ont des perméabilités membranaires différentes et des systèmes de transport d'ions différents (Oren, 1999). Les mécanismes par lesquels le potassium est transporté dans le cytoplasme varient suivant l'organisme considéré. Par exemple, l'*Archaea Halobacterium salinarum* importe passivement l'ion K^+ alors qu'une pompe ATP-dépendante est nécessaire pour l'accumulation de K^+ chez *Haloferax volcanii* (Oren, 1999). L'expulsion des ions Na^+ implique deux étapes : 1) le Na^+ est transporté à l'intérieur de la cellule avec l'ion Cl^- par l'intermédiaire d'une pompe à chlorure (Muller and Oren, 2003) ; 2) le gradient électrochimique en ions sodium

est maintenu à travers la membrane par l'extrusion de Na^+ grâce à un système anti porteur Na^+/H^+ ou à une pompe à Na^+ (Oren, 1999).

Toute la machinerie intracellulaire de ces organismes doit être fonctionnelle en présence de concentrations molaires de sels et possède donc des propriétés inhabituelles. Les protéines des *Halobacterium* et d'autres halophiles qui accumulent du sel sont enrichies en acides aminés acides (Glu, Asp) par rapport aux acides aminés basiques (Lys, Arg). De plus le contenu en acides aminés hydrophobes est relativement bas. Ces protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles à de fortes concentrations en sels mais elles requièrent de fortes concentrations en sels pour leur stabilité et leur activité. Le manque de flexibilité et d'adaptabilité au changement de concentration en sels du milieu est le prix à payer pour ces microorganismes habitués à vivre à de fortes concentrations en sels. (Oren, 2002).

La deuxième stratégie dite « Salt-out » permet aux microorganismes de se développer en condition hypersalée grâce à l'utilisation de solutés compatibles. Les solutés compatibles sont des molécules organiques qui peuvent être synthétisées par les cellules ou dans certains cas disponibles et prélevés à partir du milieu environnant de la cellule. Une large variété de solutés compatibles est utilisée, parmi lesquels l'ectoïne, la glycine bêtaïne, des sucres simples, certains acides aminés (Roberts, 2005, figure 8). Ces molécules sont retrouvées chez les *Bacteria* halophiles mais aussi chez les *Archaea* méthanogènes halophiles. L'utilisation de ces composés permet une plus grande flexibilité : ces microorganismes n'ont pas besoin d'adapter leurs protéines intracellulaires et peuvent donc se développer dans une gamme plus large de concentrations en sels. Seules les protéines membranaires en contact avec le milieu extérieur et les enzymes extracellulaires sécrétées dans le milieu extérieur doivent rester fonctionnelles à forte salinité.

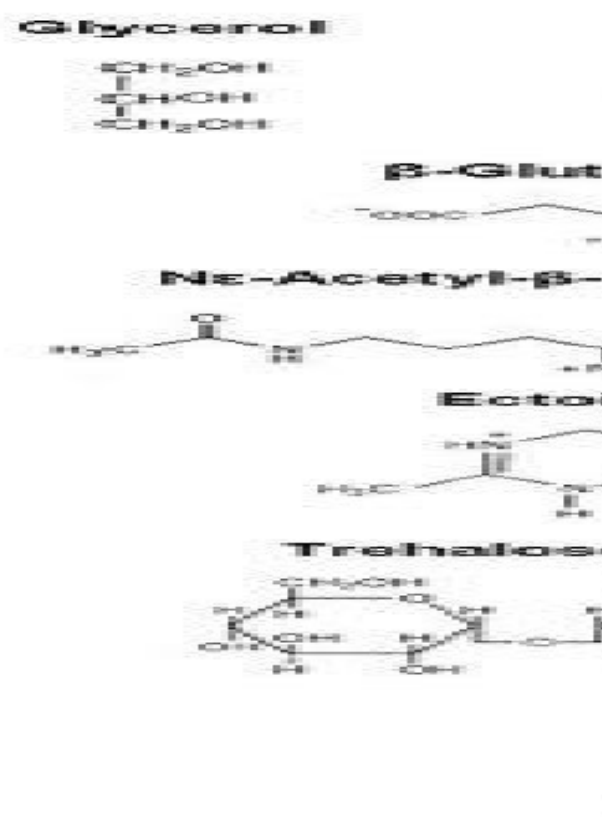


Figure 8: Représentation de certains solutés compatibles utilisés par les microorganismes dans la stratégie « Salt-out ».

Le coût énergétique entre les deux stratégies est différent, la stratégie « Salt-in » est moins coûteuse en énergie par rapport à la stratégie « Salt-out » qui va nécessiter la biosynthèse de grandes quantités de solutés compatibles. Oren (1999) a calculé le coût énergétique théorique de la production des solutés compatibles. Ainsi pour les microorganismes hétérotrophes, 23 moles d'ATP sont nécessaires pour la biosynthèse du glycérol et 79 moles d'ATP pour la synthèse du tréhalose et du saccharose. La biosynthèse d'une mole d'ectoïne ou d'une mole de glycine bêtaïne coûte approximativement 40 moles d'ATP. En considérant, que les solutés compatibles sont présents à des concentrations molaires, parfois proches de 8 M, à l'intérieur des cellules pendant un stress osmotique, il est évident que la stratégie des solutés compatibles est coûteuse en énergie. Pour ces raisons, on peut dire que la survie des organismes qui utilisent la stratégie des solutés compatibles dans les environnements hypersalés est dépendante de deux facteurs : leur capacité à maintenir leur métabolisme de base et la dépense énergétique pour la production

des solutés compatibles et/ou à leur présence dans l'environnement, par exemple libérés par des cellules mortes ou excrétés par des producteurs de solutés compatibles.

II.8. Halophilie et exobiologie.

L'eau est l'élément indispensable à la vie terrestre. C'est cet élément qui est recherché en priorité pour savoir si une forme de vie présente ou passée a pu se développer par exemple sur une des planètes du système solaire ou sur des exoplanètes. La présence d'eau sur notre planète serait probablement la conséquence d'un bombardement de météorites, ce qui impliquerait l'existence de planètes dans notre système solaire ou d'exoplanètes qui auraient eu de l'eau sur leur sol (Grady, 2006). L'évidence de la présence de l'eau, présente ou passée, sur d'autres planètes peut être révélée par l'observation de canaux, de rivières, de glace, de roches sédimentaires, incluant des halites déposés et formés à partir de saumures anciennes (Grady, 2006). En considérant les propriétés de préservation des cristaux de sels et la mise en évidence que des microorganismes appartenant au domaine des *Haloarchaea* peuvent être préservés au cours de temps géologiques, l'hypothèse que des traces de vie passées peuvent être trouvées dans les cristaux d'halite ou autres environnements salés sur d'autres planètes peut être abordée.

Il est admis que la planète Mars, après la planète Terre, serait une planète où la vie pourrait s'être formée. Des cristaux d'halite ont été retrouvés sur des météorites Martiennes (e.g. ALH84001; Conrad and Neelson, 2001). De plus l'observation et les études sur le littoral proche de Arabie et de Deuteronilus sur Mars suggère la présence d'un océan similaire à celui de la Terre datant de 2 à 4 millions d'années (Perron et al., 2007). La disparition de cet océan de la planète aurait entraîné la formation de saumures (Knauth and Burt, 2002). La formation de ces cristaux de sels pourraient avoir protégé les cellules de la rupture cellulaire due aux températures très basses qui règnent sur Mars (moyenne journalière de la température -60°C; Grady, 2006) et ainsi permis aux microorganismes halophiles et halotolérants de survivre.

Plus récemment Europa, un satellite de Jupiter, a fait l'objet d'un intérêt scientifique important dans la recherche de la vie sur les planètes de notre système solaire. En effet, suite à la mission Galileo, la présence d'un océan sous la surface glacée de ce satellite a été révélée (Greeley and Fagents, 2001). Des données plus importantes sont nécessaires pour définir la

composition ionique de cet océan sur Europa. Les modèles suggèrent que cet océan serait hypersalé et composé de Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} et Cl^- (Kargel et al., 2000) permettant ainsi seulement aux microorganismes halotolérants ou halophiles de s'y développer (Marion et al., 2003).

En considérant les exemples de Mars, Europa et des météorites, il apparaît clair que des microorganismes pourraient avoir occupé ou avoir été préservé dans le corps des exoplanètes. Ces microorganismes doivent être capables de surmonter un grand nombre de stress tel que les radiations cosmiques et solaires. Kminek et collaborateurs (2003) (Kminek et al., 2003) ont estimé que les spores pourraient survivre pendant 100 à 160 millions d'années s'ils sont enfouis dans des sédiments à une profondeur de 3 m sous la surface de Mars. Comme nous l'avons exposé précédemment, les halophiles extrêmes piégés dans des cristaux d'halite sont plus résistants aux radiations (solaires et cosmiques) que les spores.

En supposant que les microorganismes piégés dans des matrices minérales sont capables de survivre sur des temps géologiques et ainsi peuvent être retrouvés sur notre planète ou sur d'autres planètes, alors la question du transfert de ces microorganismes d'un corps astral à un autre peut être soulevée. La réponse à cette question est reliée à la théorie de la lithopanspermie, c'est-à-dire à l'hypothèse que la vie sur Terre proviendrait de collisions accidentelle entre la Terre et des corps extraterrestres rocheux qui auraient voyagé à travers l'espace et ensemencé la Terre.

A part la préservation à long terme, la survie sur le long terme, la protection contre les radiations, les microorganismes doivent avoir aussi résisté au vide qui règne dans l'espace et résisté à l'impact du choc du corps extraterrestre sur la Terre. L'*Archaea* halophile *Halococcus chaoviatoris* piégée dans des cristaux d'halite peut survivre pendant trois semaines dans l'espace suggérant que les *Haloarchaea* peuvent survivre simultanément aux expositions UV et au vide durant le voyage dans l'espace (Mancinelli and Klovstad, 2000). Les trois semaines d'exposition ne permettent pas, au vu des temps très court d'exposition, par rapport au temps de voyage estimé des corps extraterrestres, d'étayer la théorie de la lithopanspermie. Des expériences plus longues sont nécessaires pour valider l'hypothèse que les microorganismes piégés dans des matrices minérales peuvent résister sur le long terme à l'exposition aux UV et au vide spatial, par

exemple, en mesurant le taux de mortalité des microorganismes en fonction du temps d'exposition.

Le deuxième point qui correspond à la résistance des microorganismes piégés dans une matrice minérale à l'impact du choc entre les deux corps rocheux n'a pas été étudié sur les *Archaea*. Des expériences sont nécessaires pour démontrer que des cristaux d'halite piégés dans le centre d'un projectile pourrait permettre la survie des microorganismes comme cela a été démontré dans des météorites où des fluides d'inclusions ont été retrouvés (Zolensky et al., 1999; Parnell et al., 2006b).

Les études sur les cristaux d'halite et des fluides d'inclusions peuvent donner des indications sur la composition en eau, en gaz et renseigner sur la composition initiale du liquide d'un corps astral. De plus, les halites représentent un énorme potentiel pour contenir et préserver des macromolécules et des microorganismes, et plus précisément des halophiles extrêmes, sur des temps géologiques.

III. Les bassins hypersalés anoxiques profonds de Méditerranée.

III.1. Introduction

Les bassins ou lacs hypersalés profonds ont été mis en évidence dans le Golfe du Mexique (Joye et al., 2005; Joye et al., 2009), en Mer Noire (Aloisi et al., 2004), en Mer Rouge (Eder et al., 1999; Eder et al., 2001; Eder et al., 2002) et en Méditerranée (Van Der Wielen and Heijs, 2007; Daffonchio et al., 2006). La formation de ces réservoirs profonds hypersalés est conditionnée par des processus géologiques, eustatiques, un contexte topographique et à un climat favorable.

En 1961, des relevés de mesures sismiques réalisées sur le bassin Méditerranéen vont révéler la présence d'une formation géologique située entre 100 et 200 m sous le niveau de la mer (Hersey, 1965). Cette caractéristique géologique nommée réflecteur M, suit parfaitement les contours du fond de la Mer Méditerranéenne actuelle, suggérant ainsi que cette couche se soit déposée dans le passé (figure 9). L'origine de cette couche a été très largement interprétée comme étant un dépôt de sels. Cependant de nombreuses interprétations quant à l'âge et à la formation de cette couche de sels vont être émises.

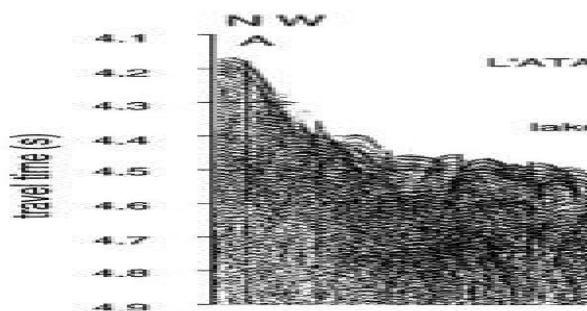


Figure 9: Présence du réflecteur M qui correspond sur l'image au « Top of Messinian evaporites » d'après Cita, 2006.

C'est seulement en 1970, au cours de la campagne 13 du programme de forage de l'océan profond (Deep Sea Drilling Project) en Méditerranée occidentale exécutée sur le navire Le Glomar Challenger que fut révélé pour la première fois la présence d'évaporites du Messinien dans le bassin baléarique en Méditerranée (Hsu et al., 1973). Cette découverte majeure va susciter un intérêt scientifique important de la part de la communauté pour comprendre et expliquer la présence de cette masse salifère sous le plancher océanique. Ce n'est que tout récemment qu'un consensus, sur la chronologie des différents processus qui ont déclenché la crise saline du messénien et qui permet d'expliquer les différentes observations, a été obtenu (Rouchy and Caruso, 2006; Cita, 2006).

III.2. Crise Saline du Messinien.

Il y a un peu moins de 6 Ma, le bassin Méditerranéen a été le siège d'un événement hors du commun et de dimension exceptionnelle : la "Crise de Salinité Messinienne" (Hsü et al., 1973). Cet événement d'origine tectonique, eustatique et de courte durée à l'échelle géologique (environ 600 000 ans) constitue l'un des plus grands épisodes évaporitiques de l'histoire de la Terre. Ses effets spectaculaires se sont traduits par d'importantes variations des paramètres physico-chimiques des masses d'eau méditerranéennes (salinité, température, oxygénation), de la profondeur d'eau dans les bassins (périphériques d'abord, profonds ensuite) et constitue une crise écologique majeure.

Jusqu'au début des années 90, la durée et la position chronologique de l'événement Messinien demeurent encore imprécises, et sont sujettes à de nombreux débats. À l'heure

actuelle, la chronologie établie fait l'objet d'un consensus général : la Crise de Salinité Messinienne a débuté vers 5,96 Ma par le dépôt d'évaporites dans les bassins périphériques méditerranéens et s'est achevée vers 5,33 Ma par la remise en eau de la Méditerranée et le retour aux conditions océaniques de mer semi-ouverte. Il est en effet aujourd'hui admis que la cause majeure de la crise saline du Messinien est la résultante d'une combinaison complexe de processus tectoniques et glacio-eustatiques qui ont progressivement et finalement isolés la Mer Méditerranée de l'Océan Atlantique.

Les processus tectoniques au niveau du détroit du Gibraltar ont entraîné une baisse des entrées d'eau de l'Océan dans la Méditerranée. La Méditerranée a un régime hydrologique complexe et se caractérise actuellement par un bilan hydrique négatif. L'évaporation sur le bassin est supérieure aux apports d'eau douce (pluie et ruissellement). En l'absence d'apports complémentaires, le niveau marin méditerranéen moyen s'abaisserait de l'ordre de 1 m/an. L'excès d'évaporation est principalement compensé par les eaux atlantiques de surface qui entrent au niveau du détroit de Gibraltar. En plus d'un volume d'eau important, ce flux entrant fournit du sel au bassin méditerranéen. Il est compensé en profondeur par un flux sortant constitué d'eaux méditerranéennes plus salées qui s'épandent dans l'Océan Atlantique à une profondeur de 1000 m (figure 10).

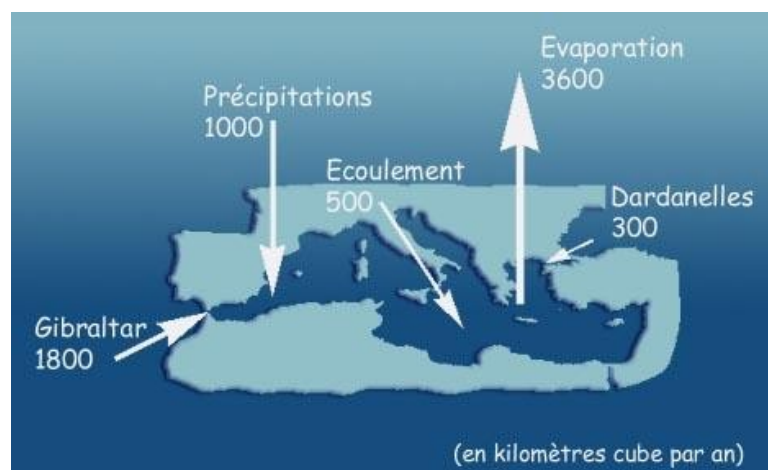


Figure 10: bilan hydrique du bassin Méditerranéen.

Il y a approximativement 7 Ma, une période glaciaire a démarré à la fin du Miocène, entraînant une augmentation de l'épaisseur de la couche de glace au pôle qui a été bien documenté en Antarctique (Rouchy et al., 2006). Le rôle de l'eustatisme a pu être mieux appréhendé par les mesures du $\delta^{18}\text{O}$ benthique. Ces mesures ont révélé deux périodes très

distinctes, en effet de fortes valeurs en $\delta^{18}\text{O}$ sont corrélées à une forte influence glaciaire. Une première période entre 6,3 et 5,57 Ma marquée avec deux pics majeurs de glaciation TG20 et TG22 respectivement à 5,85 et 5,75 Ma, le pic TG 12 marque la fin de la période glaciaire (figure 12 ; Rouchy et al., 2006). Une période de glaciation (production de glace aux niveaux des pôles) a pour conséquence une diminution du niveau de la mer. L'amplitude de la baisse du niveau de la mer a été estimée d'une dizaine de mètres jusqu'à 100 m. Ces fluctuations sont suffisamment importantes pour aggraver les effets de la tectonique qui restreint les entrées d'eau de l'Océan Atlantique en Mer Méditerranée et permettre ainsi le déclenchement de la crise saline du Messinien. Cette première période correspond au premier stade d'évaporation que comprend l'épaisse couche inférieure d'évaporite constituée d'halite (NaCl) associée à des couches de potassium et magnésium superposées. Ce processus est corrélé à un climat aride très important en Méditerranée et un niveau très faible de l'océan à cette période.

La seconde étape d'évaporation, comprenant les évaporites supérieures majoritairement composées de sulfate de calcium et de dépôts sédimentaires, correspond à la période glaciaire à partir de 5,6 Ma (figure 11). Cette période se caractérise par des entrées constantes d'eau de mer qui vont restaurer ponctuellement des conditions marines dans la partie ouest de la Méditerranée mais aussi à une augmentation des entrées en eau douce dans tout le bassin. Le régime hydrique avait entraîné des processus d'érosions très actifs pendant cette période. De plus, la grande majorité des marqueurs sédimentaires, géochimiques et biologiques argumente pour une dominance d'eau douce à saumâtre dans le bassin Méditerranéen épisodiquement interrompu par des conditions hypersalées.

La fin de la crise saline du Messinien est caractérisée par un changement hydrique qui est considéré comme exceptionnellement rapide à l'échelle géologique. Ce changement a été causé par un événement géodynamique qui a ré-ouvert de façon abrupt les connections avec l'Océan Atlantique au travers du détroit de Gibraltar (figure 12). Au début du Pliocène, le bassin Méditerranéen retrouve son niveau original d'eau de mer suite aux entrées d'eau de l'Atlantique. Les évaporites du Messinien et les dépôts clastiques sont lentement recouverts par des boues hémipélagiques, des sédiments terrigènes qui continuent encore à se déposer aujourd'hui (Rouchy et al., 2006; Cita et al., 2006).

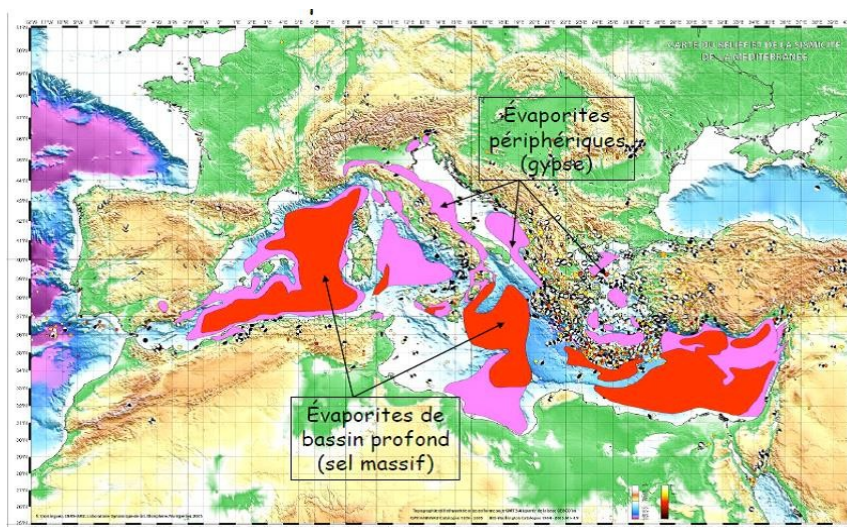


Figure 11: Distribution des évaporites en Méditerranée. En rose les dépôts de gypse, en rouge les dépôts de Halites, de potassium et de magnésium.

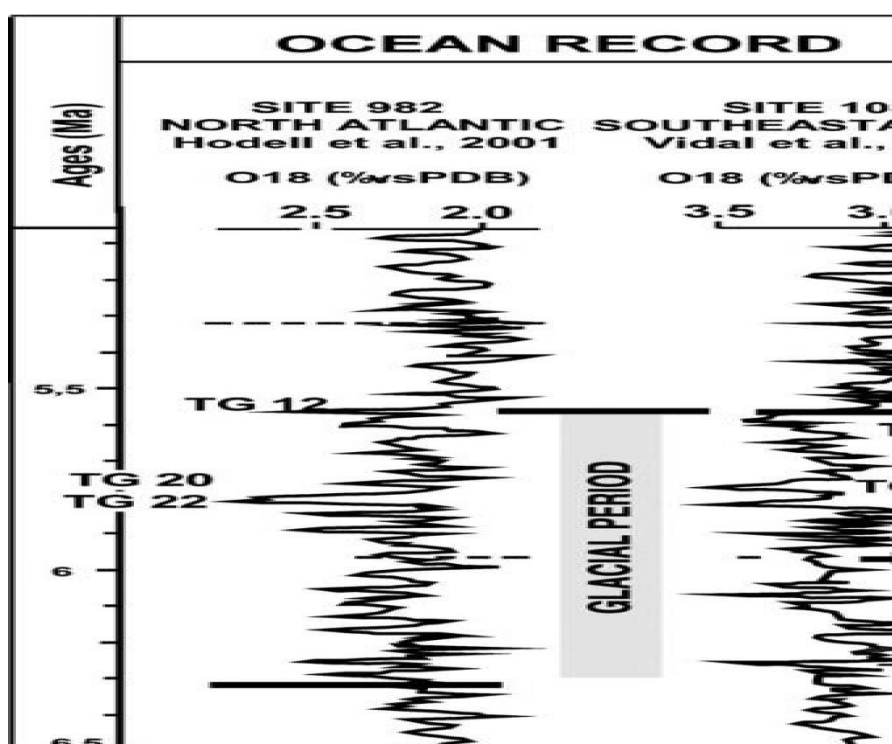


Figure 12: Corrélation entre les principaux changements hydrologiques, climatiques et les dépôts d'évaporites en Mer Méditerranée d'après Rouchy, 2006.

Dans un intervalle de temps de moins de 650 000 ans, plus d' 1 million de km³ de roches évaporitiques (principalement du gypse et de la halite) ont été déposés dans la partie plus profonde du bassin Méditerranéen, atteignant à certains endroits une épaisseur de plus de 3 km.

III.3. Formation des bassins anoxiques profonds hypersalés (DHABs) de Méditerranée.

La ride méditerranéenne est un relief sous-marin constitué d'une chaîne de montagnes immergée (longueur 1500 km, largeur 200-250 km), qui s'étend de la Mer Ionienne au bassin Levantin. Selon les secteurs, les crêtes de la ride dominent de un à deux kilomètres le fond des bassins, les plaines et les fosses abyssales ont une profondeur de 3000 à 4000 m (profondeur moyenne : 3500 m). La ride méditerranéenne est un prisme d'accrétion qui résulte de la convergence des plaques Africaine et Européenne dont la vitesse de convergence a été estimée de 35 à 38 cm/an (Le Pichon et al., 1982). La plaque tectonique Africaine plongeante favorise l'accumulation des sédiments marins et les comprime contre la plaque Européenne sus-jacente. La subduction de la plaque Africaine se produit dans une direction Sud-Ouest/Nord-Est et les sédiments sont comprimés jusqu'à former des écailles qui se redressent venant former un bourrelet caractéristique de la subduction. La topographie de la ride Méditerranéenne est unique. C'est une topographie bosselée, vallonnée (nommée « Cobblestone topography »), créée par une alternance de bassins et de reliefs verticaux. L'origine de cette topographie unique est liée à la présence des évaporites du Messinien qui s'étendent sous une fine couche, inférieure à 200 m d'épaisseur, de sédiments hémipélagiques du Plio-Quaternaire.

L'existence de bassins hypersalés sur la ride Méditerranéenne s'explique par le contexte géologique et la topographie de cette région. La dissolution des évaporites est activée quand en présence d'un relief vertical, la couche de dépôt saifère présente sous la couche de sédiments se retrouve en contact avec l'eau de mer. Une saumure dense est produite et va occuper le fond de la zone de dépression.

Trois processus vont contrôler l'évolution des bassins : i) la topologie du bassin, ii) la présence permanente d'évaporites qui affleurent et qui vont alimenter la saumure et iii) une protection contre les courants marins qui pourraient lessiver la saumure. La conséquence de ces processus résultera soit en une augmentation, une diminution ou un état constant du lac de saumure.

Le premier bassin hypersalé anoxique profond, Tyro, a été découvert au sud de la Crête en 1983 par Jongsma et collaborateurs (Jongsma et al., 1983). Un an plus tard, un second bassin, nommé Bannock, est découvert au Nord de la Libye sur la ride Méditerranéenne (Parisi et al.,

1987). En 1994- 1995 au cours du projet européen MEDRIFF (Mediterranean Ridge Fluid Flow), dans une zone très restreinte qui sera par la suite appelée le Corridor de MEDRIFF sur la ride Méditerranéenne, sont découverts les bassins Urania, Atalante et Discovery au cours de trois campagnes océanographiques sur trois navires de recherche différents qui donneront leurs noms à ces différents bassins. Au cours de ce projet, des spéculations sont émises quant à la présence d'autres bassins hypersalés dans cette zone. En septembre 2008, au cours d'une campagne océanographique programmée au Sud-Est du corridor MEDRIFF sont découverts 3 nouveaux bassins nommés Thetis, Medee et Kryos (figure 13) (La Cono et al., 2011; Yakimov et al., 2013a; Yakimov et al., 2015b).

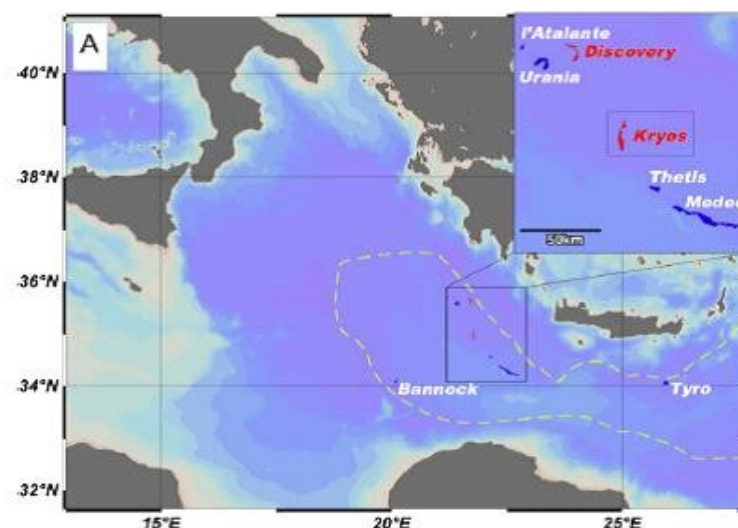


Figure 13: Localisation des bassins anoxiques profonds (DHABs) de Méditerranée (d'après Yakimov, 2013).

III.4. Caractéristiques physico-chimiques d'une saumure.

La surface de ces saumures Méditerranéennes se trouve entre 3 et 3,5 km sous le niveau de la mer et leur densité est comprise entre 5 et 13 fois celle de l'eau de mer. En raison d'un contraste de densité de 20 à 30 % entre la saumure et la colonne d'eau subjacente, les DHABs (Deep Hypersaline Anoxic Basin) sont séparés de l'eau de mer par une étroite interface, en général inférieure à 2 m d'épaisseur. Bien que certains DHABs soient très proches géographiquement, notamment pour ceux situés dans le corridor de MEDRIFF, les différences de

composition et de concentration des éléments chimiques composant ces saumures suggèrent que les processus qui ont conduits à leurs formations sont qualitativement différents (Cf Tableau 1).

L'eau de mer, peut être concentrée par évaporation jusqu'à 10 fois sans que les sels précipitent. La salinité de la saumure formée est alors inférieure à 330 ‰. Cette saumure est alors appelée stade précoce de saumure primaire thalassique (ESPB : Early Stage Primary Brine). A ce stade les proportions de tous les ions majeurs sont caractéristiques de l'eau de mer. Si le processus d'évaporation se poursuit, la salinité augmente, les sels précipitent et changent ainsi la proportion des ions dissous, pour former le stade tardif de saumure primaire athalassique (LSPB : Late Stage Primary Brine). Deux processus peuvent permettre d'expliquer la naissance d'une saumure athalassohaline; d'une part l'utilisation du model PHRQPITZ (Wallmann et al., 1997) a révélé qu'une saumure athalassique riche en chlorure de magnésium peut être obtenue quand l'eau de mer est soumise à une évaporation allant jusqu'à la précipitation du Bischofite ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), précipitation obtenue quand 995 g du kilogramme d'eau de mer initial sont évaporé (LSPB). D'autre part, une composition similaire à une saumure athalassique peut être obtenue par mélange d'une eau de mer stabilisée avec des cristaux de bischoffite et de Kainite ($\text{KMg}_4\text{Cl}_4(\text{SO}_4)_4 \cdot 11 \text{H}_2\text{O}$). On parle alors de saumure secondaire (SB : Secondary Brine). L'analyse de la concentration en lithium permet de déterminer l'origine de la saumure athalassique. En effet, dans le cas d'une LSPB, la concentration de ce cation va s'accroître de manière linéaire car ce cation ne précipite pas avec les autres évaporites en présence de fortes concentrations en magnésium. Si la concentration en lithium est proportionnellement plus faible que la concentration en sels de la saumure, l'hypothèse admise pour la formation de la saumure est une solubilisation des cristaux de bischoffite dépourvus de lithium formés suite à l'évaporation totale de l'eau de mer (Wallmann et al., 1997; Wallmann et al., 2002).

Classiquement, la séquence de précipitation de sels de l'eau de mer soumis à une évaporation est la suivante : tout d'abord une précipitation des sels de calcium insolubles est observée, puis la précipitation des Halites (NaCl), du Kiesérite ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), de la Carnalite ($\text{KMgCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), de la Kaïnite ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{KCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et enfin la formation de Bischoffite ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), qui est le sel le plus soluble parmi les sels d'évaporites marins (Figure 14).

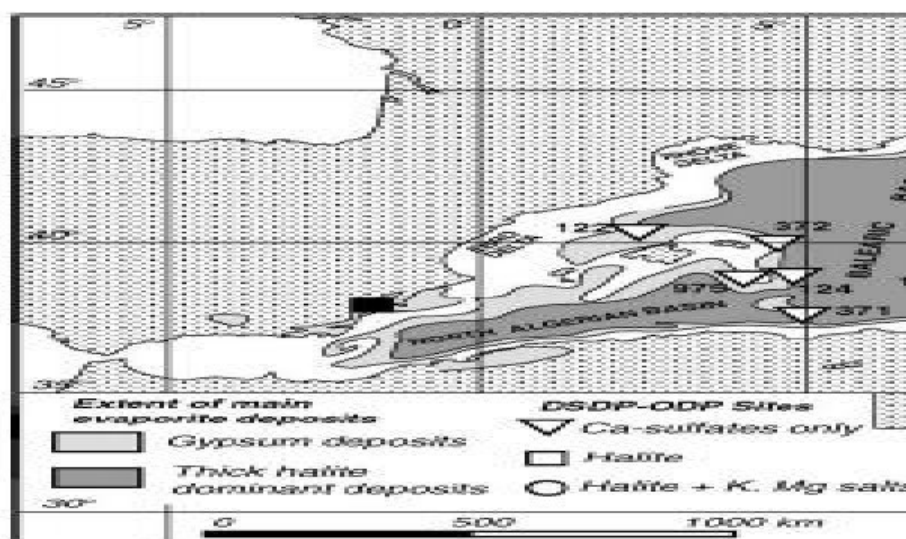


Figure 14: Représentation des différents dépôts de sels en Mer Méditerranée d'après Rouchy, 2006.

En fonction des conditions géologiques et climatiques, les saumures formées et les évaporites accumulées, vont être stockées sous le plancher océanique pendant des millions d'années. Comme nous l'avons décrit précédemment ce sont principalement les mouvements de convergence des plaques et la tectonique associés à une fine couche sédimentaire du Pliocène-quadernaire qui vont engendrer l'affleurement des dépôts salifères et la formation de saumures dans des bassins. Ces bassins hypersalés localisés à des profondeurs de plus de 3000 m et dépourvus d'oxygène seront cités dans la suite du manuscrit en utilisant l'acronyme de DHABs (Deep Hypersaline Anoxic Basin). Cependant ce seul phénomène ne peut expliquer les différences de composition et de concentration en sels observés et mesurés dans les bassins. Des processus autres que le simple affleurement des évaporites du Messinien au contact de l'eau de mer pourraient expliquer les différences chimiques observées entre les différents bassins très proches géographiquement. L'activité tectonique au niveau de la ride méditerranéenne conduit à des tensions et à la formation de fractures au niveau du plancher océanique, fractures à travers desquelles l'eau de mer va pénétrer dans les couches profondes du sédiment pour atteindre la couche de surface des évaporites. La pénétration de l'eau de mer dans les sédiments est amplifiée par la pression hydrostatique régnant à ces profondeurs (environ 35 MPa) qui favorise également la dissolution des évaporites de surface. Cette première couche de surface des évaporites comprend les sels les plus solubles. La dissolution de ces sels engendre la formation de saumure interstitielle qui se crée entre la couche salifère profonde et le sédiment du Pliocène-

quaternaire. Cette formation peut entraîner l'effondrement de la couche sédimentaire supérieure et permettre la formation d'un bassin aux caractéristiques chimiques particulières.

Tableau 1: Composition chimiques et autres propriétés des différentes saumures.

	ATHALASSOHALINE		THALASSOHALINE						
	Discovery	Kryos	L'Atalante	Urania	Medee	Thetis	Tyro	Bannock	Eau de Mer
Salinité, g.kg ⁻¹	510	471	352	240	345	348	321	323	35
Profondeur du bassin	3580	3337	3428	3489	2920	3258	3350	3300	
Sous la surface de l'eau, m									
Profondeur de la saumure, m	55	160	80		162	157	100	500	
T température de la saumure, °C	16.1	14.5	14.3						
Densité, kg.L ⁻¹	1.33	1.31	1.23	1.13	1.22	1.22	1.21	1.21	1.03
Na, g.kg ⁻¹	1.93	2.84	107	81	96	110	121	97	12.15
Cl, g.kg ⁻¹	360	321	188	132	187	188	190	191	22
Mg, g.kg ⁻¹	125	107	16	7.5	19	15	1.72	16	1.46
K, g.kg ⁻¹	3.5	3.3	14.4	4.77	18.6	9	0.74	4.96	0.44
Ca, g.kg ⁻¹	0.04	0.04	0.3	1.26	0.12	0.36	1.42	0.65	0.46
SO4, g.kg ⁻¹	10.6	31	32	10.2	19.3	25.44	5	13	3.05
Br, g.kg ⁻¹	8.81	5.6	0.49	0.72	5.2	0.48	0.1	0.72	0.07
Li, mg.kg	4.9	3.7	0.5	2.9	1.1	0.62	0.52	2	0.17
H2S, mg.kg ⁻¹	29	41	96	51	55	72	71	96	
NH4, mg.kg ⁻¹	11	16	52	52	42	50	23	60	

Les DHABS sont des environnements caractérisés par de fortes pressions hydrostatiques (>35 MPa), l'absence totale de lumière (pas de photosynthèse) et des concentrations extrêmes en sels (salinité > 30% ; 10 fois plus salés que l'eau de mer normale). Ils sont aussi caractérisés par la présence de fortes concentrations en ammonium, en hydrogène sulfuré et en manganèse. Les DHABs peuvent être considérés comme des lacs hypersalés sous-marins.

III.5. Détection des bassins hypersalés anoxiques profonds et échantillonnage des saumures.

Lors de campagnes océanographiques les DHABs sont détectés grâce à la signature caractéristique de réflexion du signal acoustique sur les images de données sismiques (figure 15). En effet, une réflexion sismique bien définie est identifiée à l'interface entre l'eau de mer et la

saumure. Une fois que cette signature est révélée, il est nécessaire d'échantillonner pour certifier la présence d'une saumure.

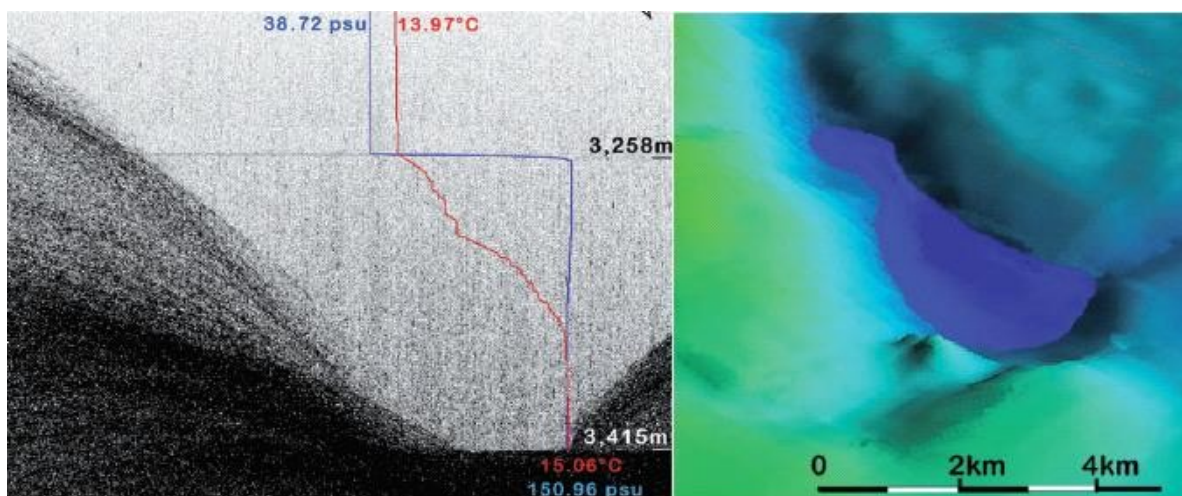


Figure 15: A gauche superposition du profil sismique et du profil CTD. En bleu le profil de salinité, en rouge le profil de température. A droite la reconstruction en 3D du bassin Thetis, bassin mis en évidence par la couleur bleue (d'après La Cono, 2011).

L'échantillonnage est en général réalisé à l'aide d'un carrousel équipé de bouteilles Niskin (de 12 à 24 en général) et d'une sonde CTD. Une CTD (Conductivity Temperature Depth) est une sonde mesurant la conductivité, la température et la profondeur de l'eau. D'autres capteurs peuvent être associés à la sonde CTD pour mesurer par exemple la concentration en oxygène, le pH, la salinité, la fluorescence, le potentiel-redox. Dans le cadre de sa politique de recherche en milieu marin, l'Union Européenne a financé le projet GEOSTAR (GEophysical and Oceanographic STation for Abyssal Research) dont l'objectif premier était la mise en place d'un observatoire marin profond. Au cours de ce projet a été développé un robot téléopéré le MODUS (Mobile Docker for Underwater Sciences) qui a été exploité dans le projet BIODEEP également financé par l'Union Européenne (Malinverno et al., 2006). Le MODUS est un robot téléopéré pouvant plonger dans les grands fonds, suspendu à un câble électromécanique permettant la navigation. Sa mobilité horizontale est possible grâce à des propulseurs électriques. La mobilité verticale est assurée par un treuil relié au navire de recherche. La caractéristique du MODUS par rapport aux autres ROV est la possibilité pour le MODUS de pouvoir supporter des charges très lourdes (jusqu'à 30 kN). Dans le cadre du projet BIODEEP qui se focalisait sur l'étude de la vie microbienne dans les DHABs, le MODUS a été utilisé et associé à deux autres modules le

SCISKID et le SCIPACK (figure 16). A l'aide du MODUS et du module SCISKID équipés de caméras, les opérations de prélèvements dans la zone de l'interface entre l'eau de mer et la saumure ont pu être réalisées avec plus de précision comparée à des prélèvements classiques réalisés avec un carrousel. Le SCIPACK est équipé de bouteilles NISKIN, d'une sonde CTD et de différents capteurs.



Figure 16: Schéma opérationnel du déploiement du MODUS et du SCIPACK à partir du navire de Recherche. A : mise à l'eau du SCIPACK. B : Déploiement du MODUS avec le SCISKID. (D'après Maliverno, 2006).

IV. Ecologie microbienne des DHABs.

IV.1. Formation de la chemocline.

En raison d'un contraste de densité de 20 à 30 % entre la saumure piégée au fond du bassin et l'eau de mer de l'océan profond subjacente, les DHABs vont être séparés de l'eau de mer par une étroite interface, en général inférieure à 2 m d'épaisseur. Dans cette interface se dessine une chemocline qui correspond à un changement brutal de la valeur de différents paramètres physico-chimiques : salinité, oxygène, potentiel redox. L'exemple illustré ci-dessous représente la chemocline du bassin hypersalé Thetis (figure 17). Entre l'eau de mer et la saumure une zone d'interface de deux mètres d'épaisseur, entre 3258 et 3260 mètres, se dessine, dans laquelle les concentrations en oxygène et en sels varient considérablement. En général dans les différents bassins hypersalés nous retrouvons cette structure et définissons dans la zone d'interface plusieurs compartiments : une interface haute (upper interface), une interface centrale (middle interface) et une interface basse (lower interface). Entre l'eau de mer et l'interface haute, il

est parfois décrit une zone de transition qui correspond à un changement lent mais notable de la salinité (Yakimov et al., 2015a).

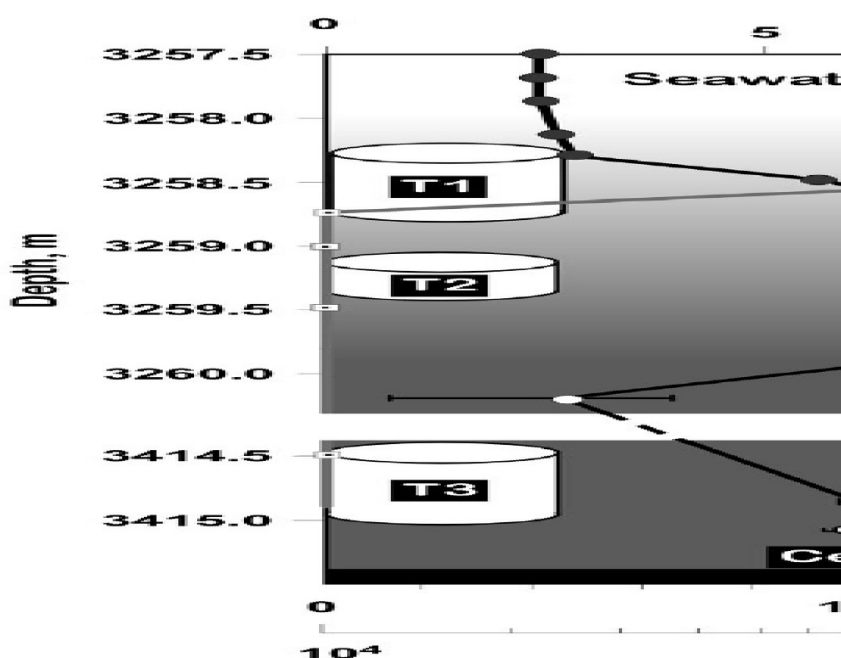


Figure 17: Représentation de l'halocline du bassin Thetis d'après La Cono, 2011. Les cylindres T1, T2 et T3 représentent les zones de prélèvements réalisés avec les bouteilles Niskin.

Enfin, dans certains bassins comme Medee sous la zone de l'interface basse on peut définir plusieurs saumures, qui se différencient en fonction de la concentration en sels (Yakimov et al., 2013b) (figure 18).

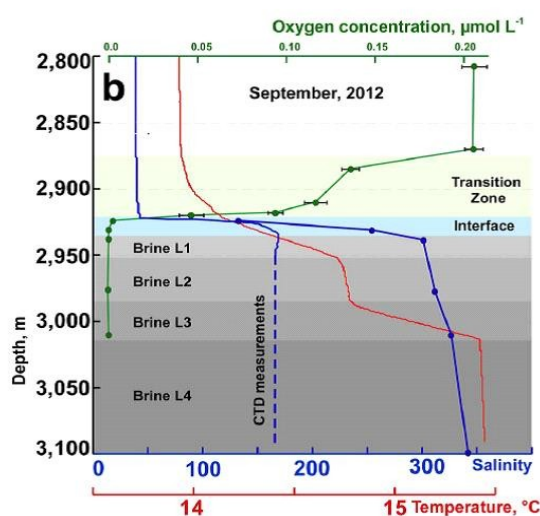


Figure 18: Chemocline du bassin Medee d'après Yakimov, 2013, illustrant la présence de plusieurs saumures (L1 à L4) de salinité croissante.

Le bassin Urania est associé à un volcan de boues actif dans sa partie profonde la plus à l'Ouest du bassin la présence d'un volcan de boues actif et constitue un bassin unique en son genre. Au niveau de ce volcan, des anomalies thermiques ont été mesurées avec des températures atteignant 45°C (Yakimov et al., 2007a). Des analyses chimiques ont révélé que des boues chaudes enrichies en méthane (800 µM) provenaient d'un réservoir sédimentaire plus chaud et localisé sous les évaporites du Messinien (Charlou et al., 2003). En dépit du fait que les boues soient plus chaudes et moins salées (salinité 10%, température 45°C) que la saumure située au-dessus du volcan (salinité 27%, température 16°C), le mélange des deux compartiments ne se réalisent pas, en raison de la plus haute densité de la couche du fond riche en argile (figure 19).

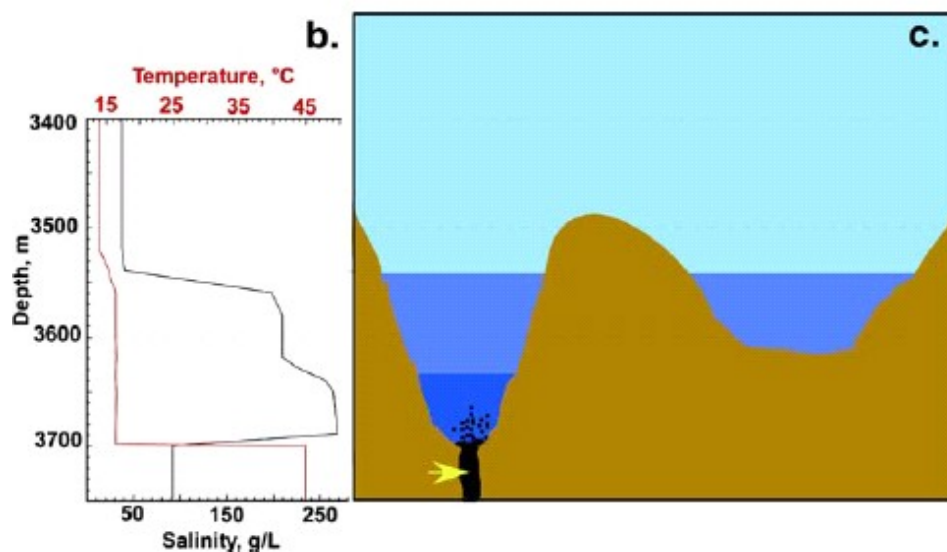


Figure 19: Profils de salinité et de température au-dessus du volcan de boue dans le bassin Urania (b). La flèche jaune indique la présence du volcan sous la saumure du bassin Urania (d'après Yakimov, 2007).

IV.2. Mesure et mise en évidence d'activités microbiennes dans les DHABs.

Les activités microbiennes telles que la méthanogenèse et la sulfato-réduction ont été mesurées dans quatre DHABs de l'Est Méditerranéen : L'Atalante, Discovery, Urania et Bannock

(van der Wielen et al., 2005). Les échantillons ont été collectés à l'aide de l'équipement MODUS-SCIPACK au niveau de l'eau de mer du fond, de la zone d'interface à la saumure. L'activité de méthanogenèse a été estimée en quantifiant la cinétique de production du méthane produit dans l'atmosphère des flacons sérums anaérobies qui ont été amendés d'échantillons de saumure ou de sédiments, avec ou sans précurseurs de la méthanogenèse. Le taux d'activité de sulfato-réduction a été estimé en mesurant la production de sulfure marqué en ^{35}S à partir du sulfate ^{35}S injecté.

Par opposition à la concentration en méthane dissous présente dans l'eau de Mer avec des concentrations maximales atteignant 2 à 4 nM, les DHABs contiennent des quantités importantes de méthane : une dizaine de micromolaire dans Discovery, plusieurs centaines de micromolaires dans Bannock et L'Atalante et millimolaires dans Urania. La production de méthane observée était minimale dans l'eau de mer naturelle, puis elle augmente de façon graduelle dans l'interface puis de l'interface haute vers l'interface basse et était maximale dans la saumure. La production maximale de méthane a été enregistrée dans le bassin Urania où les valeurs maximales de méthane dissous ont aussi été mesurées. La réduction du sulfate a été mise en évidence dans tous les échantillons analysés. La réduction du sulfate était maximale à l'interface pour les bassins Discovery et L'Atalante. Dans le bassin Bannock, la réduction des sulfates diminue dans l'interface basse et était maximale dans l'interface haute. Les mesures des taux d'activités de sulfato-réductions sont 2 à 3 fois plus importantes dans les bassins Urania et L'Atalante par rapport aux bassins Bannock et Discovery. De la même façon, les mesures de sulfato-réduction les plus fortes ont été observées dans le bassin L'Atalante qui contient aussi les concentrations en sulfate les plus importantes ainsi que dans Urania où des concentrations importantes en sulfure sont détectées (Van der Wielen et al., 2005 ; Daffonchio et al., 2006).

Dans cette même étude, réalisée par Van Der Wielen et collaborateurs, des mesures de l'activité métabolique ont été réalisées. La dégradation de deux substrats fluorogéniques, tels que la L-Leucine-7-amino-4-methylcourmarin et le 4-methylumbelliferyl-phosphate permettant de révéler l'activité aminopeptidase d'une part et l'activité phosphatase d'autre part par des ectoenzymes, a été déterminée. L'assimilation de l'acide glutamique marquée au ^{14}C a aussi été mesurée.

Tableau 2: Synthèse des activités métaboliques mesurées dans différents DHABs (d'après Daffonchio, 2006).

Characteristics determined	L'Atalante brine	Bannock brine	Urania brine	Discovery brine	Discovery interface	Seawater
Metabolic activities						
Aminopeptidase activity (nmol AMC liter ⁻¹ h ⁻¹)	0.46	0.13	0.16	1.34	2.38	0.27
Phosphatase activity (nmol MUF liter ⁻¹ h ⁻¹)	n.d.	1.46	1.14	2.52	0.92	5.86
Glutamic acid uptake (pmol liter ⁻¹ h ⁻¹)	n.d.	3.49	1.23	2.93	2.36	98.05
Methane production rate (μM CH ₄ day ⁻¹)	16.93	4.24	85.79	2.65	2.26	0
Sulfate reduction rate (μM H ₂ S day ⁻¹)	82.15	7.80	29.82	23.91	16.27	0.236

Les activités des ectoenzymes, l'assimilation de l'acide glutamique, la réduction des sulfates et la production de méthane sont détectées à la température *in situ* dans la saumure et dans les échantillons de la zone d'interface. Ces résultats démontrent que les microorganismes peuvent être actifs dans les conditions extrêmes du bassin athalassique Discovery. Les taux d'activités ectoenzymatiques sont plus élevés dans la saumure de Discovery que dans les trois autres bassins thalassiques. Au contraire, la production de méthane et la sulfato-réduction sont plus faibles à Discovery que dans les autres bassins. Ces résultats semblent indiquer que les processus métaboliques hétérotrophes sont plus importants que la méthanogénèse et la sulfato-réduction dans le bassin Discovery (Daffonchio et al., 2006).

IV.3. Mesure de l'abondance microbienne.

Les mesures d'abondance des microorganismes dans les DHABs sont classiquement réalisées, après fixation des échantillons, à l'aide de fluorochromes intercalant l'ADN (ex : 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)). Le suivi de l'abondance microbienne dans les DHABs démontrent une augmentation significative du nombre de microorganismes dans la zone interface par rapport à la quantité de microorganismes présent dans l'océan profond et la saumure elle-même (Daffonchio et al., 2006 ; Van Der Wielen et al., 2005 ; La Cono et al., 2011 ; Yakimov et

al., 2007; 2013; 2015). A environ 3000 mètres de profondeur le nombre de microorganismes est compris entre $1,6 \cdot 10^4$ et $3,9 \cdot 10^4$ cellules/mL (Van der Wielen, et al., 2005; Yakimov et al., 2015). Pour les saumures, il a été dénombré $7,8 \cdot 10^4$ cellules/mL pour L'Atalante, $4,7 \cdot 10^4$ cellules/mL pour Bannock, $1,5 \cdot 10^5$ cellules/mL pour Urania, $1,9 \cdot 10^4$ cellules/mL pour Discovery, $8 \cdot 10^4$ cellules/mL pour Medee, $4,6 \cdot 10^5$ cellules/mL pour Kryos, $7,11 \cdot 10^4$ cellules/mL pour Thetis. L'ensemble des dénombrements réalisés dans les différentes zones de l'interface (haute, moyenne, basse) indique une augmentation du nombre de microorganismes pour l'ensemble des différents bassins. L'ordre de grandeur à retenir est d'une augmentation d'au moins un facteur 10 en concentration cellulaire dans l'interface. Dans le bassin thalassique Thetis, la concentration cellulaire maximale est atteinte à des salinités de 12,3%, ce qui correspond à la zone de l'interface basse du bassin avec des valeurs de $5,58 \cdot 10^4$ cellules/mL (La Cono et al., 2011) (figure 20). Dans le bassin athalassique Kryos, les concentrations cellulaires maximales sont observées dans la couche de l'interface correspondant à la limite chaotrope des macromolécules biologiques due à la concentration en magnésium avec des valeurs de $5,57 \cdot 10^5$ cellules/mL (Yakimov et al., 2015).

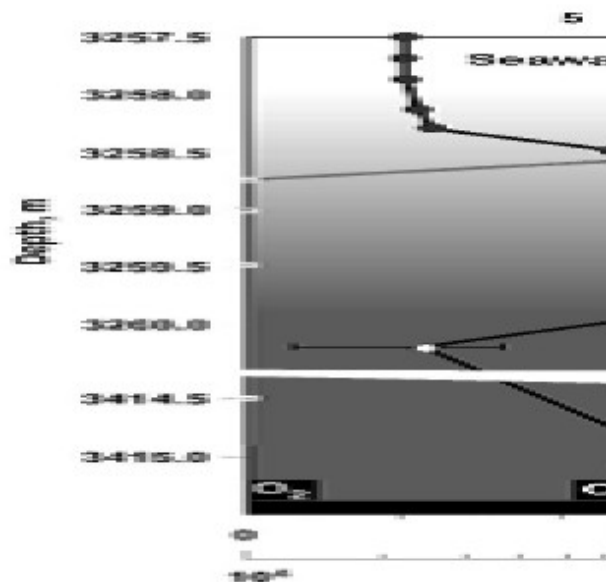


Figure 20: Evolution de l'abondance bactérienne dans le bassin Thetis d'après La Cono, 2011.

En parallèle de ces mesures d'abondance microbienne, le ratio entre le nombre de *Bacteria* et d'*Archaea* a, dans certains cas, été calculé. Cette mesure a été réalisée en employant la technique FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) à l'aide de sondes spécifiques du domaine *Bacteria* (EUB338) et du domaine *Archaea* (ARCH915) (Van Der Wielen et al., 2005). Les auteurs conscients des mises en oeuvre de cette technique sur des environnements hypersalés, font l'hypothèse que les problèmes d'hybridation à fortes salinités ont le même impact aussi bien sur les bactéries que sur les archées. Les auteurs établissent alors une abondance relative et l'exprime ensuite sous la forme d'un ratio bactéries sur archées. Les résultats indiquent que les microorganismes appartenant au domaine *Bacteria* dominant dans les bassins de L'Atalante, Bannock, Discovery. Par contre l'abondance relative des *Archaea* est plus importante dans le bassin Urania.

Plus récemment, la technique CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition coupled with Fluorescence *In situ* Hybridization), variante de la technique FISH qui permet d'augmenter la sensibilité de la technique a été utilisée sur des échantillons du bassin Medee (Yakimov et al., 2013 ; Yakimov et al., 2013b). Les résultats ont démontré là aussi une dominance en abondance relative du domaine *Bacteria* par rapport au domaine *Archaea* de l'eau de Mer jusqu'à la saumure (figure 21).

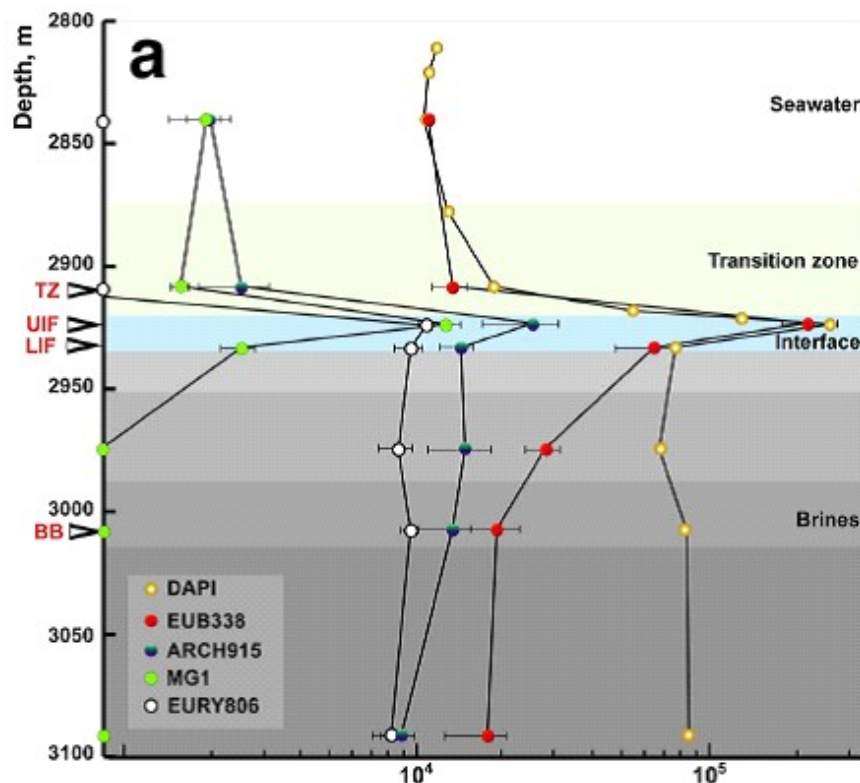


Figure 21: Profil d'abondance microbien en fonction de la profondeur à l'aide d'un intercalant de l'ADN (Dapi, Jaune) et de sondes spécifiques des *Bacteria* et *Archaea* d'après Yakimov, 2013.

On note sur cette figure (figure 21) que dans la saumure, les représentants archéens appartiennent en grande partie au phylum des *Euryarchaeota*, et que l'addition du nombre des archées plus le nombre des bactéries ne couvre pas la valeur estimée de l'abondance microbienne totale évaluée à l'aide du DAPI. La sous estimation des densités cellulaires *Bacteria* et *Archaea* par rapport aux abondances totales s'explique par la spécificité des sondes utilisées d'une part et les conditions d'hybridation d'autre part.

IV.4. Diversité moléculaire dans les DHABs.

Pour étudier la diversité microbienne à l'aide d'outils moléculaires, les échantillons collectés sont en général filtrés avec des tailles de pore de 0,2 μm afin de concentrer les cellules. Le volume filtré va dépendre de la densité du liquide. En effet, plus la densité augmente, plus le filtre

se sature rapidement. Les filtres sont ensuite congelés (-20°C, -80°C) avec ou sans liquide de suspension dans le filtre avant que les ADN ou les ARN soient extraits.

Dans l'étude des bassins Bannock, L'Atalante, Urania, Discovery, l'ADN des différents échantillons sont extraits selon une méthode employant une lyse chimique, enzymatique et mécanique. Enfin les ADN sont extraits à l'aide d'une étape phénol/chloroforme (van der Wielen et al., 2005). L'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S est réalisée en utilisant des amorces universelles puis ces amplicons sont clonés dans un vecteur de clonage. Au total 90 clones bactériens et 90 clones archéens ont été séquencés. Dans les 4 saumures analysées des 4 bassins, la mise en évidence d'une nouvelle division candidate est révélée. Cette division candidate nommée MSBL1 (Mediterranean Sea Brine Lake 1) représente de 50 à 91% des clones archéens retrouvés dans les saumures. L'analyse phylogénétique de ces séquences positionne cette nouvelle lignée dans une branche profonde des *Euryarchaeota*. L'activité potentielle de méthanogénèse a été attribuée à cette lignée MSBL1 dans les DHABs en raison de leur position phylogénétique proche de groupes méthanogènes. La diversité bactérienne est quant à elle plus diversifiée avec des séquences identifiées dans les Gamma, Delta et Epsilon-protéobactéries, des Sphingobacteria et des séquences appartenant à la division candidate KB1. Cette dernière division candidate avait été mise en évidence la première fois dans le bassin profond hypersalé de Kebrit en Mer Rouge (Eder et al., 1999). La lignée KB1 forme une branche profonde dans l'arbre du vivant entre les *Aquificales* et les *Thermotogales* (Reysenbach, 2015a ; Reysenbach, 2015b).

L'étude réalisée par Daffonchio et collaborateurs (2006) sur le bassin Bannock montre la présence de 5 autres divisions candidates, noté MSBL2, à 6. Dans leur approche, les auteurs réalisent des banques de clones à partir de l'ADNr 16S amplifié par PCR mais aussi à partir des ADNrc 16S proxy généralement utilisé comme marqueur d'activité. La division candidate MSBL2 est phylogénétiquement proche de la division candidate SB1 qui avait été identifiée au niveau du bassin hypersalé profond Shaban localisé lui aussi en Mer Rouge. Les séquences affiliées à cette division sont retrouvées dans la zone d'interface de différents bassins hypersalés mais pas dans la saumure. Les divisions candidates MSBL3, à 6 sont retrouvées dans les parties les plus profondes et les plus salées des bassins, nous indiquant que les représentants de ces lignées sont probablement adaptés aux conditions hypersalées.

La question de la stabilité des marqueurs génétiques (ADN et ARN) en condition hypersalée fut appréhendée dans le cas du bassin athalassique Discovery (Hallsworth et al., 2007b). Les

fonctions métaboliques de méthanogénèse et de sulfato-réduction qui avaient été mises en évidence par Van der Wielen (2005), ainsi que les gènes codant pour l'ARNr 16S vont être ciblées. Les gènes ciblés pour la méthanogénèse sont *mcrA*, qui code pour la sous-unité alpha de la methylcoenzyme M reductase, et *dsrAB* codant pour la sous-unité alpha et Beta de la sulfite reductase dissimilatoire. Les résultats démontrent que les gènes codant pour l'ARNr 16S sont détectés soit par rétro-transcription ou amplifiés directement par PCR tout le long de la chemocline jusque dans la saumure (5 M MgCl_2). De la même façon, les gènes *mcrA* et *dsrAB* ont été détecté par amplification direct de l'ADN tout le long de l'halocline jusque dans la saumure. A l'inverse, la rétro-transcription puis amplification par PCR des ARNm des gènes *dsrAB* et *mcrA* n'ont été détecté que des échantillons montrant une concentration maximale de 1,88 M de MgCl_2 pour le gène *dsrAB* et de 2,23 M pour le gène *mcrA*. Ces résultats indiquent d'une part que la méthanogénèse et la sulfato-réduction ne seraient actives que dans la partie haute de l'interface où les concentrations en MgCl_2 sont inférieures à 2,23 M. D'autre part l'amplification par PCR de tous les marqueurs dans l'halocline et la saumure suggère que les cellules sont mortes ou non métaboliquement actives et que les marqueurs biologiques restent stables et intègres. Pour répondre à la question de la stabilité des marqueurs génétiques en présence de fortes concentrations en MgCl_2 ($> 2,23$ M), des cellules en phase exponentielle de croissance de l'espèce bactérienne halophile *Marinobacter* souche D-5, isolée de la zone interface du bassin Discovery, ont été inoculées dans un milieu contenant 5 M de MgCl_2 (Hallsworth et al., 2007). La capacité des auteurs à extraire les acides nucléiques et à réaliser leur amplification par PCR et RT-PCR a été analysée afin de rendre compte de la stabilité des acides nucléiques en milieu hypersalé (figure 22).

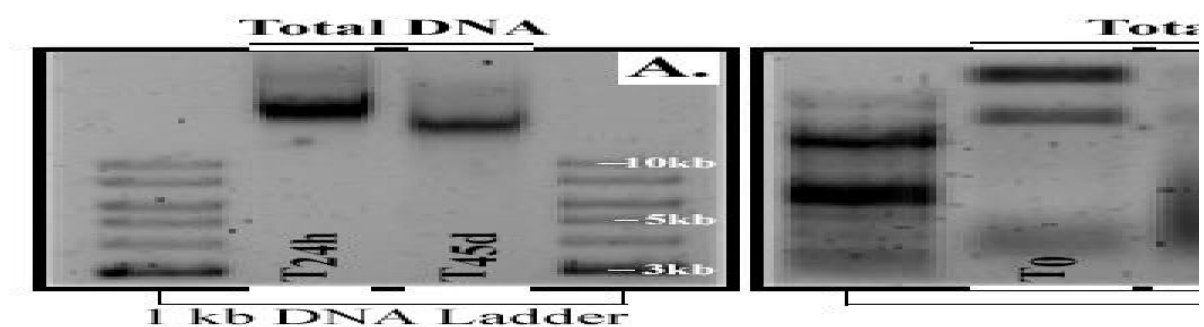


Figure 22: Expérience démontrant la stabilité des ADN, ARN, mRNA en condition hypersalée au cours du temps (d'après Hallsworth, 2007). Dans le cadre C, on observe d'une part que l'ADNr 16S est amplifié et rétro-transcrit jusqu'à 45 jours d'incubation et d'autre part que la rétro-transcription et l'amplification du gène *gyrB* est négative dès 24 heures d'incubation.

La figure 22 démontre que les ADN sont très faiblement dégradés après 45 jours d'incubation et que les ARN 16S et le gène *gyrB*, qui code pour le gène de la sous-unité bêta de l'ADN topoisomérase, sont amplifiés par PCR sur l'ensemble de la période. A l'inverse, les ARNm sont rapidement dégradés et l'amplification du gène *gyrB* n'a été possible que dans l'échantillon soumis à une heure d'exposition au $MgCl_2$. La capacité à amplifier l'ARN 16S sur toute la période d'exposition reflète une stabilité plus importante des ARNr comparée aux ARNm, mais aussi certainement du ratio plus important d'ARNr par rapport aux ARNm dans une cellule (ratio 1000/1, ARNr/ARNm). Cette étude démontre que i) les signatures de vie dans les milieux hypersalés doivent être validées par des bio-marqueurs ayant un temps de vie courts tels que les ARNm et ii) que les approches portant sur l'amplification par PCR des ADN ne donnent pas nécessairement des résultats valides.

Les DHABs de la Mer Méditerranée sont localisés à une profondeur de plus de 3000 mètres. Les différents équipements qui permettent d'échantillonner cet environnement, classiquement un carrousel équipé d'une sonde CTD et de bouteilles Niskin, nécessitent un certain temps de descente, d'échantillonnage puis de remontée à bord du navire océanographique. En général on estime à une heure de descente, une heure de remontée, le temps d'échantillonnage dépend du nombre de bouteilles Niskin à déclencher. Une fois à bord du bateau, il est nécessaire de mesurer la densité effective du prélèvement dans la bouteille Niskin à la fois dans le haut et le bas de la bouteille à l'aide d'un réfractomètre manuel. Pour 24 bouteilles, il faut environ une heure pour mesurer l'ensemble des densités dans les différentes bouteilles. Si on ajoute les temps nécessaires à la remontée du carroussel, la mesure des densités dans les différentes bouteilles sur le pont du navire, les premières filtrations ne démarrent que trois heures après le prélèvement. Ce temps, ainsi que la dépressurisation des échantillons sont des paramètres à avoir à l'esprit lors de l'interprétation des résultats (obtenus par les approches moléculaires sur les ARN messagers et les approches culturelles).

La vie n'est possible qu'en présence d'eau sous forme libre. La disponibilité en eau, ou activité de l'eau (noté a_w), va être affectée par la présence de sels et peut donc être une forme de stress importante pour la cellule. Le chlorure de Magnésium est très soluble dans l'eau (542 g.L^{-1} à 20°C) et on peut atteindre des concentrations de 5 M de $MgCl_2$ dans des saumures telles que Discovery ou 4,38 M dans la saumure de Kryos. La présence des ARN messagers du gène *mcrA* dans le bassin Discovery à des concentrations inférieures à 2,23 M de $MgCl_2$ a été révélée,

ce qui correspond à une activité de l'eau (a_w) de 0,801. L'activité de l'eau est donnée dans une échelle de 0 à 1, dans laquelle 1 est la valeur maximale de disponibilité de l'eau ou celle de l'eau pure. Dans le bassin thalassique de L'Atalante, les ARN messagers du gène *mcrA* ont été retrouvés pour une activité de l'eau de 0,741 ce qui correspond à 4,67 M NaCl et 0,41 M $MgCl_2$. Les résultats démontrent que la vie en présence de fortes concentrations en $MgCl_2$ ne serait pas possible. D'un autre côté, des environnements moins riches en $MgCl_2$ et associés à d'autres anions, comme le sulfate qui est très présent sur notre planète peuvent abriter des communautés de microorganismes halotolérants.

Les analyses moléculaires de la diversité microbienne réalisées sur les bassins Thetis (La Cono et al., 2011), Medee (Yakimov et al., 2013) et Kryos (Yakimov et al., 2015) ont été menées par retro-transcription des ARN puis amplification par PCR. L'ensemble de ces études a permis de révéler la diversité microbienne dans ces bassins et de proposer l'existence de nouvelles divisions candidates. Une quinzaine de MSBL divisions candidates sont aujourd'hui répertoriées (Yakimov, communication personnelle)(figure 23).

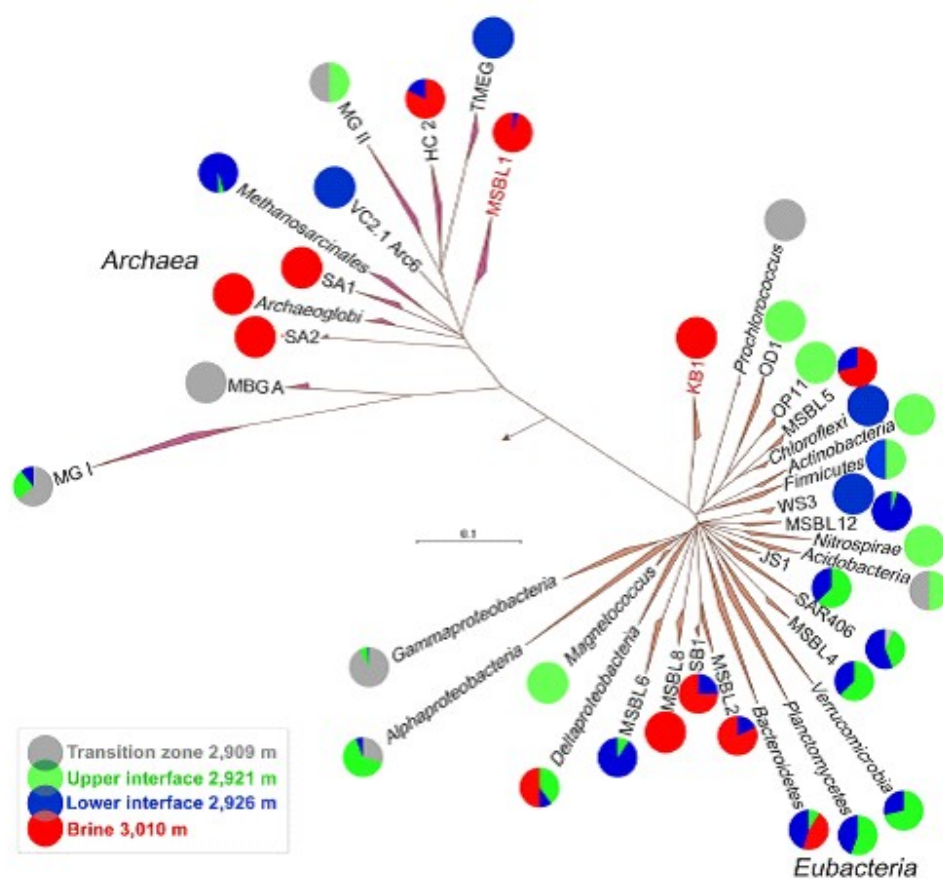


Figure 23: Diversité phylogénétique microbienne du DHAB Medee. La stratification et l'abondance relative de chaque groupe phylogénétique en fonction des différentes zones de l'halocline sont indiquées sous forme de pourcentage d'abondances relatives (d'après Yakimov, 2013).

Les résultats obtenus démontrent une distribution stratifiée des populations microbiennes qui se développent dans les différents compartiments du DHAB Medee. En effet, les séquences des représentants des divisions candidates MSBL1, MSBL8, KB1, SA1, SA2 ainsi que la division des *Archaeoglobales* sont uniquement retrouvés dans la saumure du bassin. Dans l'interface, haute et basse, de nombreuses séquences sont retrouvées (MSBL4, MSBL6, MSBL12, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*...). C'est aussi dans le compartiment interface qu'est montrée la plus grande diversité (Indice Chao 2, 75%).

L'approche moléculaire réalisée sur le bassin athalassique Kryos (4,38 M de $MgCl_2$) démontre également une stratification importante des communautés microbiennes en fonction de l'halocline comme dans le cas des bassins thalassiques (Yakimov et al., 2015). De la même façon que dans les bassins thalassiques Medee et Thetis, les représentants des divisions

candidates MSBL1, HC1 (Halophilic Cluster 1) et KB1 deviennent majoritaires dans les compartiments plus salés du fond du bassin. D'autre part, les clones affiliés à la division candidate MSBL1 des bassins Discovery et Kryos forment un groupe séparé des séquences de MSBL1, issues de bassins thalassiques, suggérant ainsi l'existence d'une communauté microbienne adaptée aux environnements riches en $MgCl_2$.

Des séquences proches des membres des lignées KB1, SA2 et MSBL1, et des genres *Halorhabdus* et *Halanaerobium* sont donc détectées dans les saumures de différents lieux géographiques du bassin Méditerranéen. La question intéressante qui en découle concerne leur origine. Certains auteurs suggèrent que ces microorganismes seraient disséminés par l'eau de mer et établiraient des populations une fois retrouvé le biotope nécessaire à leur croissance. Cette hypothèse est peu fiable car les séquences correspondant à ces microorganismes n'ont pas été retrouvées dans la colonne d'eau. Une alternative intéressante pourrait être que la colonisation des différentes saumures soit réalisée par la dissolution des cristaux de sels formés lors de la crise saline du Messinien. La dissolution des cristaux de sels permettrait la libération des microorganismes piégés dans ces cristaux. Si les conditions « *in situ* » sont en adéquation avec le potentiel physiologique des microorganismes libérés, ils pourraient se développer à l'intérieur du gradient formé entre la saumure et l'eau de mer. La Mer Rouge et la Mer Méditerranée ont été isolées des eaux océaniques, conduisant à la formation d'un vaste bassin évaporitique et la formation d'une couche importante d'évaporites. Pendant cette période, la Mer Rouge et la Mer Méditerranée étaient connectées, ce qui a pu permettre la formation d'une couche continue d'évaporite entre les deux bassins. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la présence de ces microorganismes très proches phylogénétiquement (Ex : KB1, MSBL1, ..) dans les différents bassins aussi bien en Mer méditerranée que dans la Mer Rouge.

IV.5. Diversité microbienne cultivable dans les DHABs.

Peu d'études sur ces bassins se sont focalisées sur la culture et très peu d'isolats ont été décrits et entièrement caractérisés. La première étude a été déclenchée suite à la découverte d'une couche gélatineuse d'origine biologique à partir de carottes de sédiments des bassins Tyro et Bannock (Erba et al., 1987; Erba, 1991). Des souches affiliées au genre *Vibrio*, *Staphylococcus* et *Pseudomonas* ont été isolées (Brusa et al., 1997; Brusa et al., 2001). Sass et

ses collaborateurs ont employé onze méthodes de culture pour tenter d'isoler des microorganismes clefs au niveau de l'interface entre la saumure et l'eau de Mer du bassin Urania. Les différentes méthodes de culture sont réalisées en faisant varier la source de carbone, les accepteurs et donneurs d'électrons. Au total, 70 souches aérobies, chimioorganotrophes ou chimiolithotrophes ont été isolées et appartiennent à des genres classiquement rencontrés dans l'environnement marin (Sass et al., 2001). Les auteurs suggèrent donc que les microorganismes que l'on retrouve dans la zone interface proviennent de l'eau de mer et qu'ils atteignent l'halocline par sédimentation lente. Une approche culturale a aussi été tentée sur l'interface du bassin Bannock (Daffonchio et al., 2006). Au total 84 souches ont été isolées et identifiées par séquençage de leur ADNr 16S. Ces souches sont assignées aux phyla des Firmicutes, Bacteroidetes, alpha, gamma et epsilon-protéobactéries. Ces isolats appartiennent à des divisions mises en évidence par les approches moléculaires. Cependant aucune des séquences des isolats obtenues ne correspond aux séquences présentes dans les banques de clones. La plupart des microorganismes isolés sont des souches halophiles modérées anaérobies facultatives, capables de croître en aérobiose ou par fermentation et dénitrification. Deux isolats appartenant au phylum des *Bacteroidetes* démontrent moins de 92% de similitude de leur ADNr 16S avec des souches connues. Ces deux microorganismes sont des halophiles modérés et fermentent un grand nombre de sucres et de polymères comme seules sources de carbone et d'énergie. A ce jour, aucune de ces deux souches n'a été entièrement décrite et déposée dans une collection publique internationale de microorganismes. De ce même bassin, Sorokin et collaborateurs (2006) (Sorokin et al., 2006) ont isolés une souche sulfo-oxydante proche de l'espèce *Halothiobacillus halophilus* (hybridation ADN/ADN>70%).

Une approche culturale a été réalisée sur les sédiments de quatre bassins L'Atalante, Bannock, Discovery et Urania (Sass et al., 2008). Au total 89 isolats ont été obtenus et étaient phylogénétiquement proches du genre *Bacillus*. Les 2/3 de ces isolats n'étaient pas capables de se développer à la salinité de la saumure et étaient donc sûrement présents à l'état d'endospores dans la saumure. Cette hypothèse est étayée par le comptage des endospores dans la saumure qui représente jusqu'à 5% de la population totale des microorganismes.

Une nouvelle *Archaea* halophile *Natrinema salaciae* a été isolée de la saumure du bassin Medee et a été complètement caractérisée (Albuquerque et al., 2012). Le bassin Medee est un bassin thalassique avec quatre saumures distinctes, et des salinités comprises entre 305 et 345

g.kg⁻¹ de sels, et des températures *in situ* variant de l'interface à la saumure de 14,75 à 15,46°C respectivement. Cet isolat se développe en condition aérobie ou anaérobie, en réduisant les nitrates, à une température optimale de croissance de 45°C. Sa salinité optimale est de 2,6 à 3,4 M de NaCl. Sa température minimale de croissance est de 25°C ce qui signifie que cet isolat ne peut avoir une activité métabolique dans les conditions *in situ*. Les auteurs ne discutent pas ce point mais suggèrent que la capacité de cet isolat à croître en condition anaérobie lui permettrait de coloniser les couches anoxiques et hypersalées du fond du bassin. L'analyse de l'ADNr 16S démontre que cet isolat est proche de séquences issues de sédiments de Medee mais aussi de séquences d'échantillons du bassin Thetis obtenues tout deux par des approches moléculaires. Cet isolat est en outre très proche phylogénétiquement de la souche *Natrinema ejinorensis* JCM 13890^T et de *Haloterrigena longa* JCM 13562^T avec des valeurs de similitude de l'ADNr 16S de 98 et de 97,9% respectivement. Les valeurs d'hybridation ADN/ADN entre ces souches, qui établissent de façon claire la présence d'une nouvelle espèce, sont inférieures à 37% et donc bien inférieures au seuil de 70% recommandé pour définir l'espèce (Wayne et al., 1987). Ces fortes valeurs de similitude ne permettent pas d'établir que cet isolat soit une souche endémique de ces bassins, c'est-à-dire piégée dans des cristaux d'halite lors de la crise saline du Messinien et préserver au cours des temps géologiques.

Très récemment un nouveau métabolisme qui n'avait jamais été mis en évidence dans le domaine *Archaea* a été découvert. Il s'agit de l'oxydation de l'acétate associée à une réduction du soufre en condition anaérobie (Sorokin et al., 2016). Ce métabolisme a été dans un premier temps observé à partir d'échantillons du lac hypersalé de la steppe de Kulunda (Altai, Russie) et 4 souches ont été isolées. L'analyse de leurs ADNr 16S les placent dans la famille des *Halobacteriaceae* et elles forment un nouvel embranchement avec des identités de séquences de 92-93% avec les membres du genre *Halarchaeum* et *Halobacterium*. Ces faibles valeurs d'identités de séquences leur permettent de proposer la création d'un nouveau genre, le genre « *Halanaeroarchaeum sulfurireducens* ». Les auteurs vont utiliser la même approche culturale sur des échantillons hypersalés du bassin Medee et réussir à isoler la souche M27-SA2. L'affiliation phylogénétique de cette souche la place elle aussi dans le nouveau genre *Halanaeroarchaeum*. La description complète de l'espèce type du genre *Halanaeroarchaeum sulfurireducens* souche HSR2 isolée du lac hypersalé de la steppe de Kulunda a été réalisée. Cette étude ne présente pas les caractéristiques chimiotaxonomiques de la souche M27-SA2 (Sorokin et al., 2016). Des

informations personnelles obtenues auprès de Michail Yakimov nous indiquent que la souche M27-SA2 aurait une température de croissance optimale de 40-45°C avec une salinité optimale de 220-240 g.l⁻¹ de NaCl. La température minimale de croissance n'a pas été déterminée, on ne peut donc pas conclure sur l'activité de ces souches *in situ* dans le bassin Medee.

IV.6. Hypothèse sur l'activité métabolique des divisions candidates MSBL1 and KB1.

Dans la saumure du bassin Medee, les populations de microorganismes affiliées aux lignées MSBL1 et KB1 sont très largement dominantes (Yakimov et al., 2013). L'activité trophique et le rôle des représentants de la lignée KB1 restent énigmatiques jusqu'à ce jour cependant les représentants de la lignée MSBL1 seraient probablement composée de méthanogènes halophiles sans vraiment pouvoir le démontrer (Van der Wielen et al., 2005). La détection des ARNm de la methyl coenzyme M reductase (*mcrA*) confirme que la méthanogénèse est active dans la saumure de Medee. L'analyse des séquences du gène *mcrA* obtenues démontre qu'elles forment un clade avec des séquences d'autres DHABs bien séparé des autres séquences affiliées au gène *mcrA* du genre *Methanohalophilus*. De plus, aucune séquence d'ADNr 16S affiliée au genre *Methanohalophilus* n'a pu être détectée dans la saumure Medee. Il est alors proposé que les séquences du gène *mcrA* retrouvées appartiennent aux représentants de la lignée MSBL1.

Les substrats présumés de la méthanogénèse méthylotrophes en milieu hypersalé tel que la monométhylamine, diméthylamine et le triméthylamine n'ont pu être détectés dans la saumure et les sédiments de Medee. La présence de la glycine betaïne a été détectée au niveau de l'interface et de la saumure supérieure en quantité assez importante (81 et 170 nmol.l⁻¹ respectivement) (Yakimov et al., 2013). A l'inverse la concentration en acétate augmente de 132 µmol.l⁻¹ dans la saumure supérieure jusqu'à une concentration de 500 µmol.l⁻¹ dans l'interface. La diminution de la concentration de la glycine betaïne due à une probable consommation par les microorganismes et l'augmentation de la concentration en acétate due à une production par le métabolisme microbien, peut s'expliquer par une relation trophique entre ces deux substrats. Il a été démontré que deux microorganismes dont l'homoacétogène halophile extrême *Acetohalobium arabaticum* et la méthanogène halophile méthylotrophe *Methanohalobium esvaticatum* sont impliqués dans la chaîne trophique de la glycine betaïne (Zhilina and Zavarzin, 1990).

Acetohalobium arabaticum, comme les autres membres de l'ordre des *Halanaerobiales*, dégrade la glycine bêtaïne en présence d'hydrogène ou de sérine suivant la réaction de Stickland pour produire de l'acétate et de la triméthylamine (Mouné et al., 1999).

Des incubations réalisées en présence de glycine bêtaïne marquée sur des échantillons de saumure du bassin Medee amène les auteurs à suggérer que les représentants de la lignée KB1 seraient responsables de la dégradation de la glycine bêtaïne. Le TMA produit serait alors métabolisé par les représentants de la lignée MSBL1 pour produire le méthane (figure 24)(Yakimov et al., 2013).

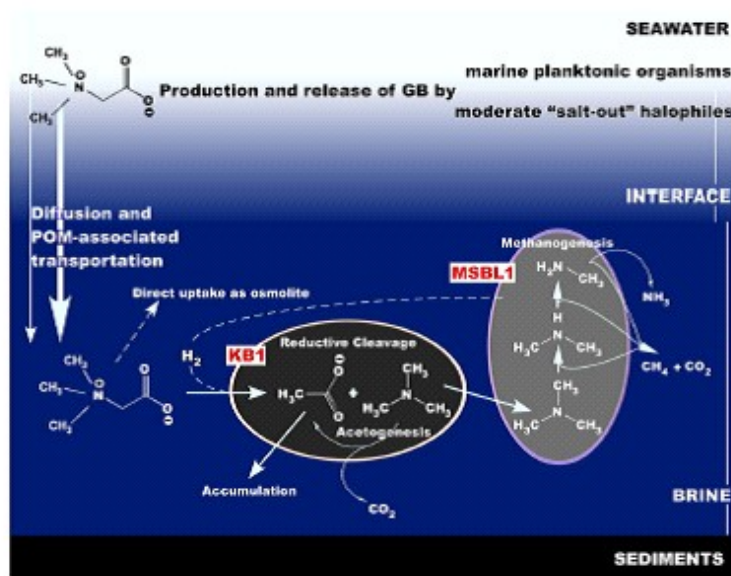


Figure 24: Hypothèse d'une relation trophique entre deux partenaires (membres des divisions candidates KB1 et MSBL1) pour l'utilisation de la glycine bêtaïne *via* le TMA. (D'après Yakimov, 2013).

Une étude récente utilisant l'approche "single-Cell" a permis de proposer après séquençage de 32 génomes amplifiés de cellules affiliées à la division candidate MSBL1 (Mwirichia et al., 2016) une reconstruction métabolique des voies de synthèse présentes dans les génomes de ces cellules.

Les génomes amplifiés provenaient d'échantillons de différents bassins de saumure localisés dans la Mer Rouge (Atlantis II, Discovery, Nereus, Erba et Kebrit). Le taux de couverture des génomes étaient de l'ordre de 56 %. L'analyse démontre que les membres de la lignée MSBL1 fermenteraient le glucose *via* la voie Embden-Meyerhof-Parnas. Cependant, en absence de matière organique carbonée, le dioxyde de carbone pourrait être fixé *via* la voie de Wood-

Ljungdahl (Berg, 2011) ou *via* le cycle de Krebs inverse ou suivant la ribulose bisphosphate carboxylase. Cependant, la présence des gènes impliqués dans la glycolyse, l'absence de l'ensemble des gènes retrouvé classiquement chez les méthanogènes et la position phylogénétique de cette division candidate amènent les auteurs à faire l'hypothèse que les MSBL1 ne seraient pas des méthanogènes, mais probablement des microorganismes fermentant les sucres et capables de croissance autotrophe (figure 26). Ce mode de vie mixotrophe confère un avantage quant à la survie de ces microorganismes dans cet environnement extrême.

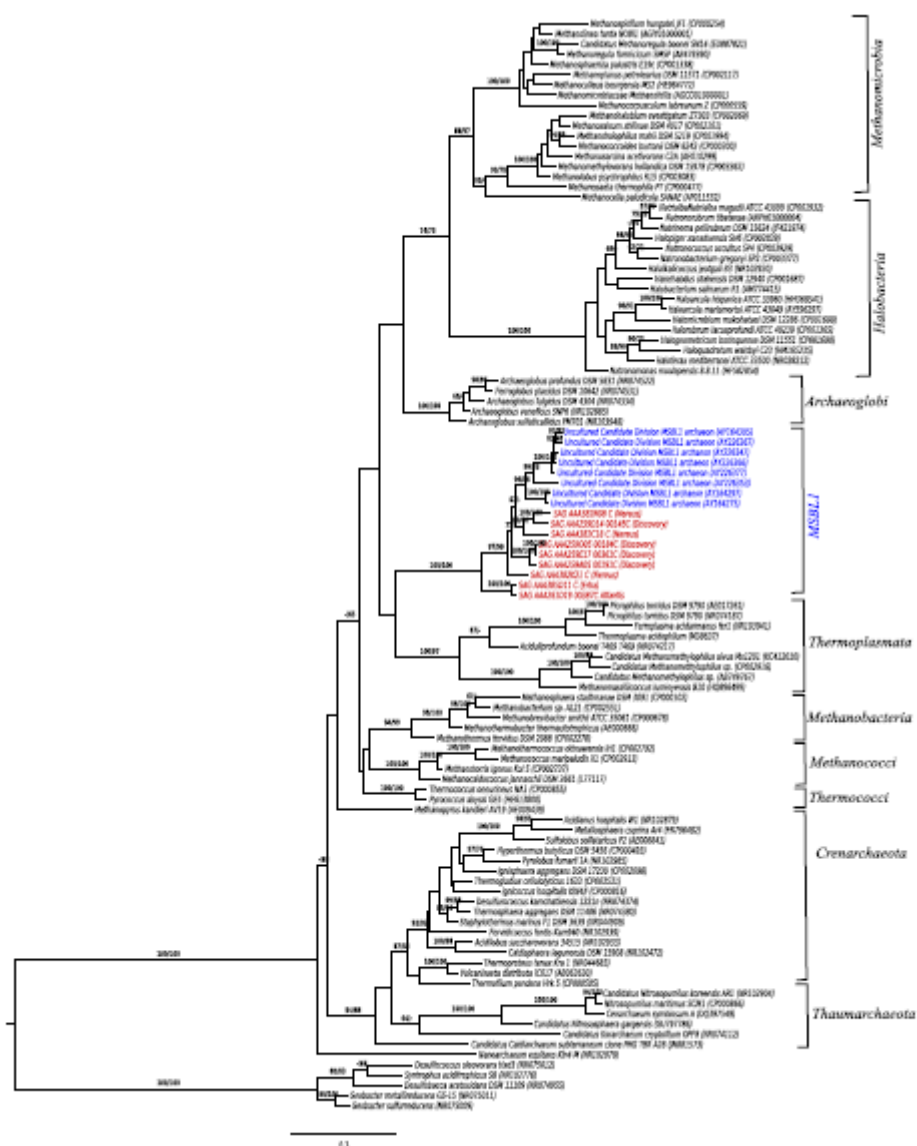


Figure 25: Arbre phylogénétique construit selon la méthode du Maximum-Likelihood obtenue à partir des ARNr16S complets présents dans les génomes amplifiés (SAGs) et les ARNr16S présents dans la banque de donnée GenBank (Mwirichia et al., 2016). En rouge, les séquences des ARNr 16S retrouvés dans les génomes

des cellules séquencées. En bleu, des séquences environnementales des ARNr 16S de la division candidate MSBL1 (origine DHABs de la Mer Rouge).

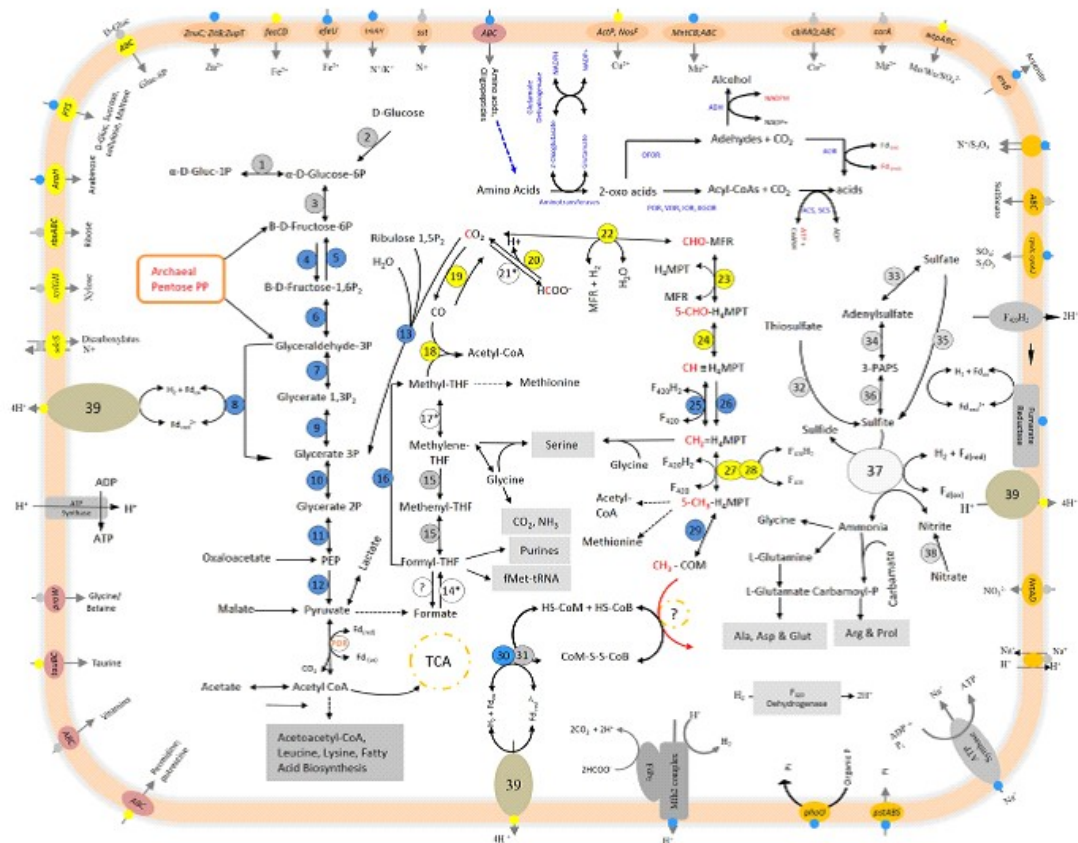


Figure 26: Schéma putatif du métabolisme global des membres de la division candidate MSBL1 basé sur l'analyse des 32 génomes de cellules uniques amplifiées (SAGs) (d'après Mwirichia, 2016). La figure résume les différentes voies métaboliques mises en évidence : glycolyse, néoglucogénèse, fixation autotrophe du CO_2 , l'assimilation des C1 suivant la voie du tétrahydrofolate/tetramethanohydroptérine.

Une approche similaire a été réalisée pour l'étude des représentants des membres de la division KB1. En effet, 16 génomes de cellules uniques amplifiées affiliées à la division KB1 ont été séquencés (Nigro et al., 2016). Les cellules ont été obtenues après échantillonnage de la saumure du bassin Orca situé dans le golfe du Mexique.

La stratégie d'adaptation osmotique des membres de la division candidate KB1 présente un intérêt particulier car ces microorganismes sont retrouvés dans des environnements hypersalés. Les membres KB1 contiennent des gènes qui codent potentiellement pour l'assimilation de la glycine bêtaïne, de la proline bêtaïne et du K^+ . Ceci nous indique une accumulation de solutés

compatibles au niveau intracellulaire (stratégie « Salt-out ») ou une accumulation de potassium, (stratégie « Salt-in »), ou bien une combinaison des deux stratégies (Oren, 2008).

L'analyse des protéines prédites dans l'analyse des génomes obtenues révèlent que le point isoélectrique de ces protéines est adapté à une stratégie « Salt-in » d'adaptation aux fortes salinités en accumulant le sel, notamment le K^+ dans son cytoplasme. L'accumulation de sels, principalement le K^+ , a été observée au départ chez les *Archaea* appartenant au phylum des *Halobacteria* et récemment chez la bactérie *Salinibacter ruber* affiliée au phylum *Bacteroidetes* (Anton et al., 2002; Mongodin et al., 2005). La distribution du point isoélectrique (PI) des protéines déduites des KB1 SAG contient une forte proportion d'acides aminés acides par rapport aux microorganismes qui n'accumulent pas le sel dans leur cytoplasme. L'abondance des acides aminés acides est estimée à 30 % des acides aminés totaux avec un PI de 5.0, ce qui est une valeur similaire au PI des protéines de *S. ruber* mais inférieure à celles des *Archaea* halophiles extrêmes comme *Halobacterium* NRC-1 (42 %, PI 4,5).

Une cassette de gènes dans les KB1 SGAs codant potentiellement pour l'assimilation de la glycine bêtaïne, précisément le système transporteur ABC de la glycine bêtaïne, a été mise en évidence. Une fois à l'intérieur de la cellule, la présence de gènes homologues du système de transporteur suggère différentes possibilités quant au catabolisme de la glycine bêtaïne. La première possibilité correspond à la diméthylation et l'utilisation du groupe méthyle comme source de carbone dans la voie de l'acetyl-CoA (Wood-Ljungdahl) (Berg et al. 2001). La méthyltransférase putative détectée et proche de la cassette pourrait transférer le groupe méthyle de la glycine bêtaïne au tétrahydrofolate et générer d'une part du diméthylglycine et le 5-méthyl-tétrahydrofolate. Ce dernier peut probablement entrer dans la voie de Wood-Ljungdahl puisque les enzymes nécessaires semblent être présentes dans le génome des KB1. Le destin du diméthylglycine dans la cellule n'est pas défini.

Une autre possibilité, qui avait été suggérée par Yakimov et collaborateurs (2013), correspond au clivage de la glycine bêtaïne en acétate et triméthylamine. L'enzyme réalisant traditionnellement le clivage de la glycine bêtaïne, la glycine bêtaïne réductase, n'a pas été détectée. Cependant cette possibilité ne peut être écartée en raison du grand nombre de SAGs obtenus. Potentiellement, les membres de la division candidate KB1, peuvent déméthyliser la glycine bêtaïne et/ou la cliver selon les facteurs environnementaux et les potentielles relations syntrophiques.

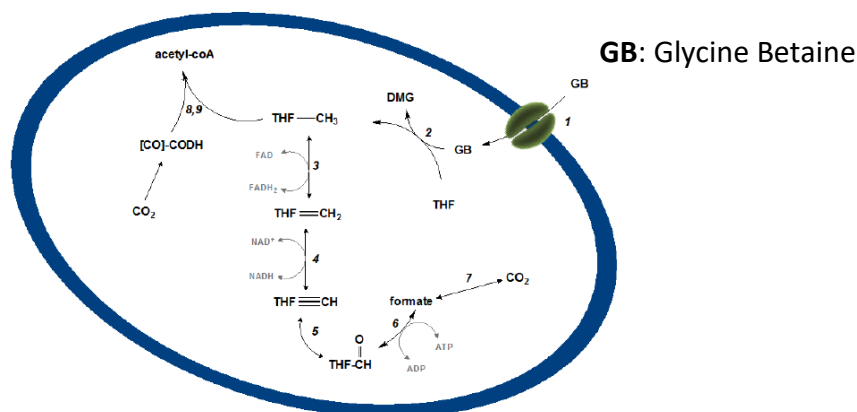


Figure 27: Représentation de la voie de clivage proposée par Nigro (2016) de la Betaïne chez les représentants des KB1. Enzyme Commission number (EC) and protein encoding gene (peg) identification number in RAST are noted where available. Etape 1, ATP binding cassette; étape 2, triméthylamine méthyltransferase, étape 3, méthylène-THF réductase, étape 4, méthylène-THF déshydrogénase, étape 5, méthényl-THF-cyclohydrolase, étape 6, formyl-THF-ligase, étape 7, formate déshydrogénase étape 8, 5-méthyl-THF:corrinoïde méthyltransferase, étape 9, complexe carbone monoxide déshydrogénase (CODH) et acetyl-coA synthase (ACS).

La présence de la division candidate MSBL1 a été révélée dans différents habitats du bassin Méditerranéen comme dans l'île de Majorque (López-López et al., 2013), les bassins anoxiques profonds hypersalés de Méditerranée (Discovery, Atalante, Bannock, Urania, Medee Thetis, Kryos, Tyro, Van der Wielen, Daffonchio, Yakimov, ...), au niveau de la Mer Rouge dans les bassins hypersalés profonds de Kebrit, Nereus, Discovery, Atlantis II, Erba (Mwirinchia et al., 2016). La signature moléculaire de la présence de cette division candidate a aussi été retrouvée dans un lac hypersalé en Egypte (Cytryn et al., 2000), dans le sédiment du lac Hypersalé Chaka en Chine (Jiang et al., 2006) et plus récemment dans un lac hypersalé du Kenya (Mwirinchia et al., 2016). La présence de cette division candidate MSBL1 n'est donc pas inféodée ou limitée aux bassins Méditerranéens mais elle est toujours associée aux environnements hypersalés. Ces environnements hypersalés représentent un des environnements les plus extrêmes sur notre

planète en raison de la salinité extrême, de l'anoxie, de la faible concentration en substrat carboné et dans le cas des DHABS de pressions hydrostatiques élevées. Les membres de cette division ont donc dû développer ou adapter des mécanismes et des propriétés leur permettant de survivre et de croître dans ces biotopes. La présence de transporteur de la glycine bêtaïne, la présence des gènes dans les génomes analysés nécessaires à la synthèse du tréhalose, connu aussi pour être un soluté compatible chez certains microorganismes, sont des éléments qui suggèrent que les MSBL1 utiliseraient la stratégie « salt out ». Cette stratégie et son métabolisme mixotrophe sont des éléments qui ont certainement permis aux représentants de cette division de s'adapter et de prospérer dans ce biotope extrême.

V. La méthanogénèse.

V.1. Introduction

La reconnaissance des *Archaea* en tant que troisième domaine du vivant (Woese et al., 1990) est relativement récente dans l'histoire de la microbiologie et résulte de l'utilisation de données moléculaires, plutôt que de données phénotypiques, pour décrire les relations évolutives (*i.e.* la phylogénie) entre les organismes vivants (Zuckerlandl and Pauling, 1965). Dans les années 70, les travaux menés par Carl Woese et ses collaborateurs ont permis d'établir les relations phylogénétiques existant au sein des Procaryotes, et entre les Procaryotes et les Eucaryotes, en se basant sur les séquences de l'ARN ribosomique (ARNr), (Woese et al., 1975; Woese and Fox, 1977). Cette molécule a été choisie en raison de son universalité au sein du vivant et de la présence de régions fortement conservées permettant d'établir des relations évolutives entre espèces extrêmement éloignées (Woese et al., 1975). La comparaison des séquences d'ARNr 18S et 16S d'organismes Eucaryotes et Procaryotes a ainsi révélée que les archées présentaient une signature distincte de celle des *Bacteria* et des *Eucarya* (Fox et al., 1977; Woese and Fox, 1977). En 1990, une description formelle du monde vivant répartie en 3 domaines fut ainsi proposée (Figure 28 ; Woese et al., 1990).

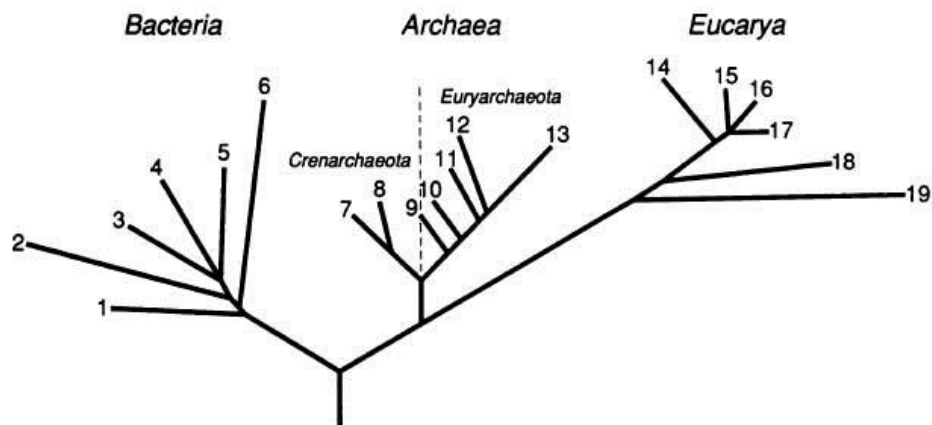


Figure 28: Arbre phylogénétique représentant les 3 domaines du vivant, basé sur l'analyse des séquences de l'ARN ribosomal (d'après Woese, 1990).

La mise en évidence de l'existence de deux mondes procaryotes fut une véritable révolution de la perception évolutive du vivant, et, outre ces considérations phylogénétiques, les archées et les bactéries diffèrent sur plusieurs aspects biochimiques et structuraux fondamentaux. La découverte du domaine des *Archaea*, qui reste aujourd'hui majeure dans l'histoire de la biologie, reposait sur l'analyse des séquences des ARN ribosomaux de microorganismes affiliés aux méthanogènes. Les microorganismes méthanogènes devenaient les premiers microorganismes affiliés à ce nouveau domaine des *Archaea*. Très rapidement, les halophiles extrêmes, les thermo-acidophiles ont été affiliés à ce nouveau domaine du vivant.

Les méthanogènes sont les microorganismes qui produisent du méthane comme produit terminal de leur catabolisme (Wolfe, 1996). La production de méthane biologique a été révélée dans de nombreux habitats anaérobies incluant les sédiments marins et d'eau douce, les eaux usées et boues de digesteurs, les centres d'enfouissement techniques de déchets, les rizières, le tractus digestif des animaux mais aussi des écosystèmes extrêmes tels que les sources hydrothermales et les environnements hypersalés (Thauer, 1998). La plupart de ces habitats possède des niches anaérobies dans lequel la méthanogénèse représente l'étape finale de la dégradation de la matière organique. Cependant dans les habitats, tels que les sources hydrothermales, les substrats de la méthanogénèse, classiquement H_2 et CO_2 , sont d'origines thermogéniques. La grande majorité du méthane générée va être ré-oxydée en CO_2 ou piégée sous forme d'hydrate de gaz dans les sédiments. Cependant une partie significative du méthane est libérée dans l'atmosphère et rentre dans le *pool* des gaz à effet de serre (Liu and Whitman,

2008) (figure 29). Au niveau énergétique, le méthane est un carburant très intéressant et de nombreuses usines se développent pour transformer le méthane produit dans différents processus de dégradation de la matière en méthane une source d'énergie valorisable (production d'énergie électrique...) et renouvelable.

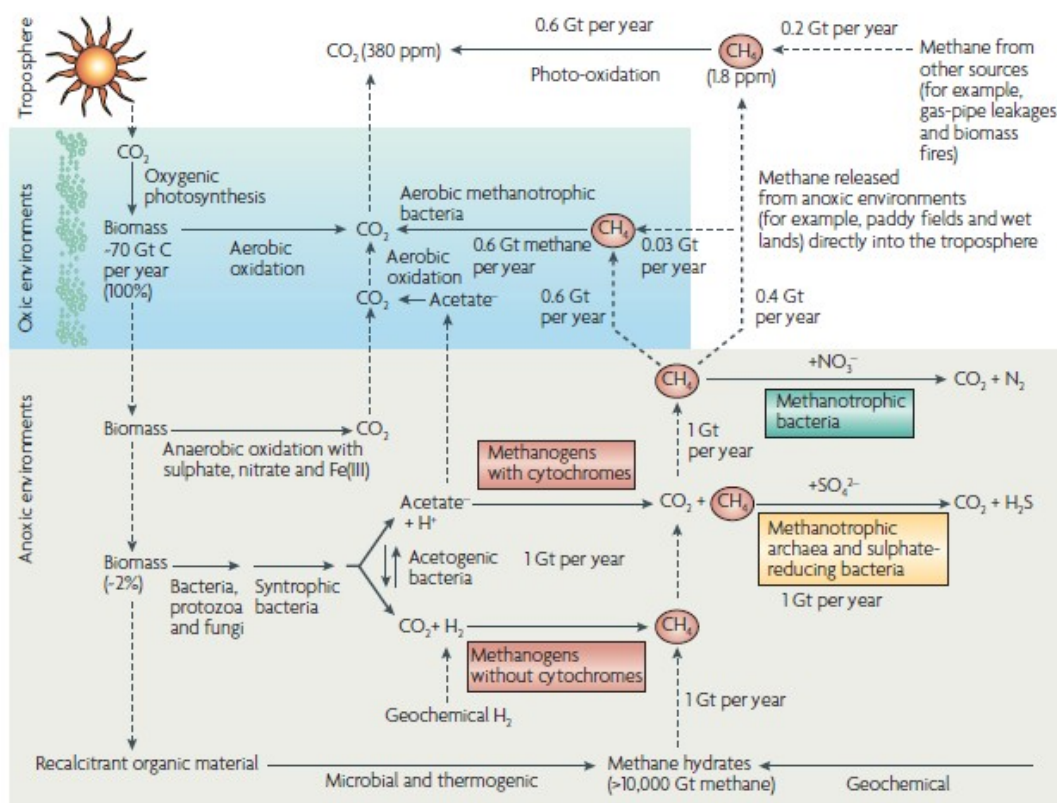


Figure 29: Le méthane dans le cycle global du carbone (d'après Thauer et al., 2008).

La plupart des microorganismes qui réalisent la méthanogénèse sont des microorganismes mésophiles, cependant des méthanogènes thermophiles (*i.e.* genre *Methanothermococcus*), hyperthermophiles (*i.e.* genre *Methanocaldococcus*, *Methanopyrus*) et des souches psychrotolérantes (*i.e.* genre *Methanogenium*, *Methanlobus*...) ont été découvertes et décrites. De la même façon chez les méthanogènes on retrouve des microorganismes capables de se développer dans un milieu de culture ne contenant pas de sels (*i.e.* genre *Methanoculleus*, *Methanobacterium*,...), des microorganismes halotolérants (*i.e.* genre *Methanococcus*, *Methanococcoides*) et des souches halophiles modérées, genre *Methanohalophilus*, qui vont croître à de fortes concentrations en sels (100 g.L $^{-1}$ de NaCl) et halophiles extrêmes avec le genre *Methanohalobium* (250 g.L $^{-1}$ de NaCl). Enfin la tolérance à la pression hydrostatique a été testée

chez certaines espèces de méthanogènes appartenant par exemple aux genres *Methanocaldococcus* (Miller et al., 1988) et *Methanopyrus* (Takai et al., 2008). La croissance sous une pression hydrostatique de 20 MPa de la souche 116 appartenant au genre *Methanopyrus* a permis de repousser les limites de croissance à 122°C, température record de croissance pour un microorganisme. L'ensemble des caractères chimio-taxonomiques cités ont permis aux microorganismes méthanogènes de se développer dans la plupart des habitats existant sur Terre et représente ainsi le seul groupe métabolique à notre connaissance possédant des microorganismes psychrophiles à hyperthermophiles, halophiles et piezophiles.

V.2. La classification phylogénétique des méthanogènes.

Sur la base de caractères phénotypiques et génotypiques, les méthanogènes se classent au sein de 7 ordres : *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales* et les *Methanomassiliicoccales* (Liu & Whitman, 2008; Lino et al., 2013; Borrel et al., 2013). Il a été suggéré que la méthanogenèse serait apparue une seule fois, au début de l'histoire évolutive des *Euryarchaeota*, mais après la divergence des *Thermococcales* (Baptiste and Walsh, 2005; Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006). Dans ce cas, elle aurait été perdue au moins 3 fois par la suite, chez les *Thermoplasmatales*, les *Archaeoglobales* et les *Halobacteriales* (Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006) (figure 30).

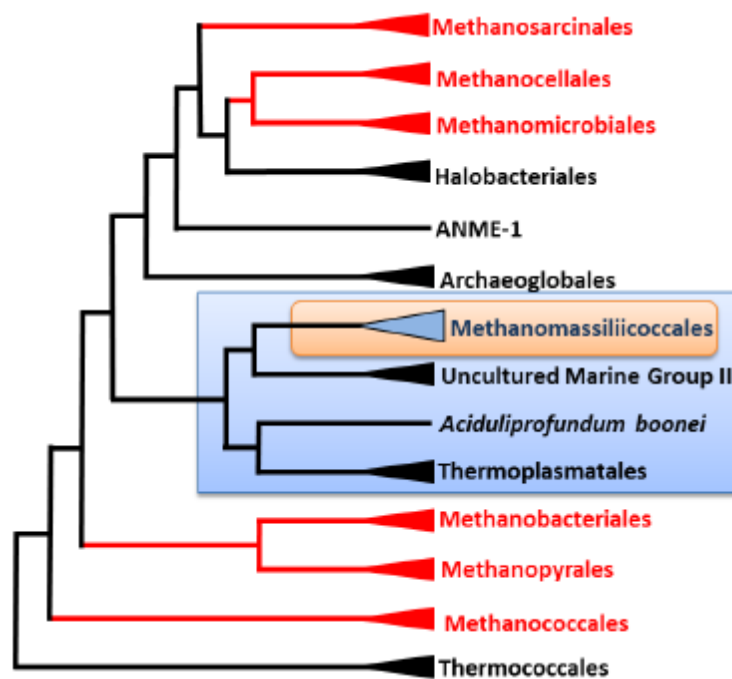


Figure 30: Position phylogénétique des 7 ordres des méthanogènes (en rouge) plus le nouvel ordre des *Methanomassiliicoccales* basée sur l'analyse des ARN ribosomiaux. (D'après Borrel, 2014).

Tout récemment un nouveau phylum archaéen le *Verstraetearchaeota* a été proposé (Vanwonterghem et al., 2016). Les membres de ce phylum seraient des méthanogènes méthylotrophes qui utiliseraient comme les *Methanomassiliicoccales* l' H_2 comme donneurs d'électrons (figure 31).

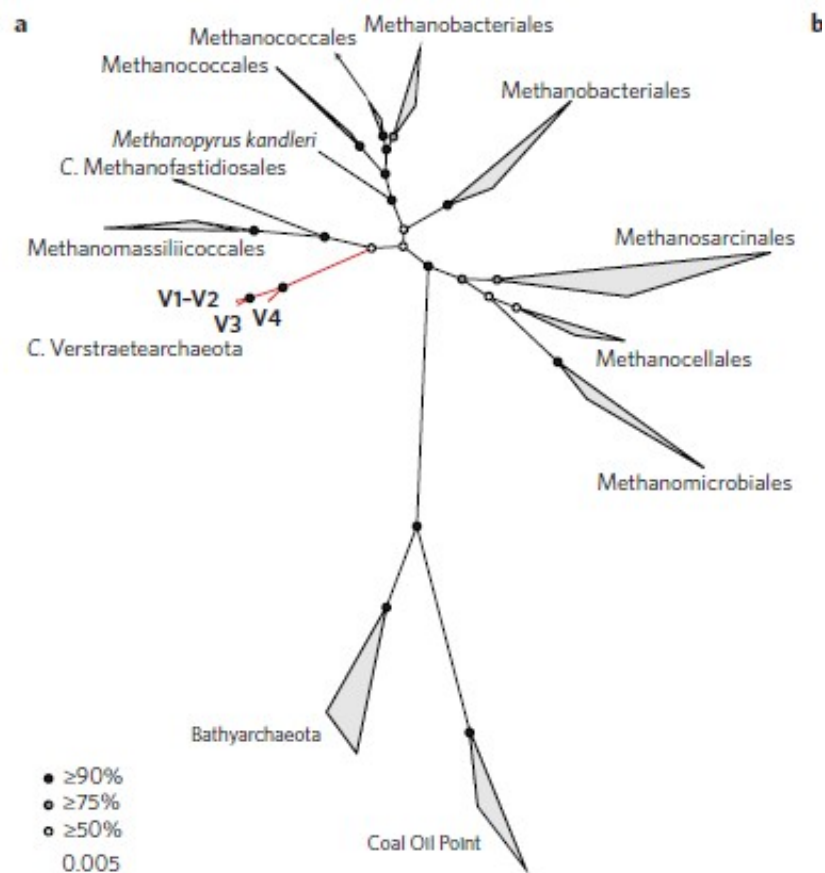


Figure 31: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse du gène *mcrA* indiquant la position phylogénétique du nouveau phylum Candidat *Verstraetearchaeota*. (D'après Vanwonterghem, 2016).

L'analyse comparée des génomes a permis de grouper les *Methanopyrales*, *Methanococcales* et les *Methanobacteriales* dans la Classe I, les *Methanomicrobiales* et les *Methanosarcinales* dans la Classe II (Baptiste and Walsh, 2005). Les caractéristiques physiologiques et métaboliques des *Methanomassiliicoccales* ne permettent pas de les relier aux classes I ou II des méthanogènes, il a été proposé de les regrouper dans une super classe les *Diaforarchaea* (Borrel et al., 2016). L'analyse phylogénétique des membres des *Methanocellales* les placent dans la classe II (figure 32).

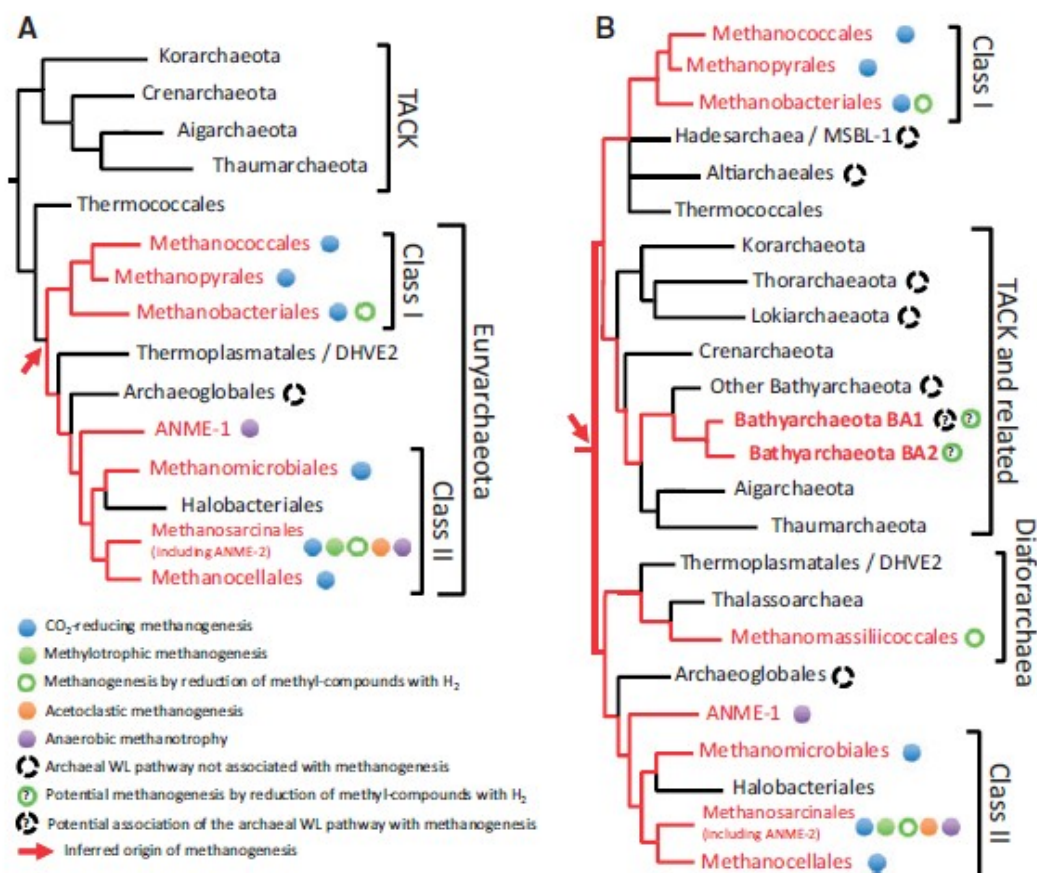


Figure 32: Phylogénie des *Archaea* à partir des génomes disponibles avant 2012 (A) et actuel (B). Les flèches rouges indiquent l'origine déduite de la méthanogénèse avec les futures divergences conduisant aux lignées qui ont gardés ce métabolisme ou la présence des homologues du gène *mcr* sont retrouvés (d'après Borrel, 2016). TACK : *Thaumarchaeota*, *Aigararchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*.

V.3. Les voies métaboliques de la méthanogénèse.

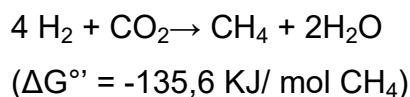
Les substrats pour la méthanogénèse sont relativement restreints (Whitman et al., 2001). Presque toutes les espèces affiliées aux ordres des *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* et des *Methanopyrales* sont hydrogénotrophes et utilisent l' H_2 et le CO_2 . Certaines espèces utilisent le formate comme donneurs d'électrons à la place de l'hydrogène. En revanche, l'ordre des *Methanosarcinales* comprend les espèces les plus versatiles du point de vue métabolique. En effet dans cet ordre, 3 voies métaboliques de la méthanogénèse sont présentes

chez certaines espèces du genre *Methanosarcina* par exemple. Cependant dans cet ordre, certaines espèces ne produisent du méthane qu'en présence d'acétate (*Methanosaeta* sp.) ou réalise la méthanogénèse méthylotrophe qu'à partir du méthanol, mono-, di-, tri-méthylamine et du di-méthylsulfide, et la méthanogénèse méthylotrophe en présence d'hydrogène (*Methanomicrococcus blatticola* (Sprenger et al., 2000)). La capacité à utiliser le méthanol en présence d'hydrogène est aussi présente chez certaines espèces de l'ordre des *Methanobacteriales* (*Methanosphaera stadtmanae*) (Miller and Wolin, 1983). *Methanosphaera stadtmanae* et *Methanomicrococcus blatticola* ont été isolé à partir d'intestins humains. La méthanogénèse méthylotrophe hydrogène dépendante pourrait être une adaptation à cet environnement.

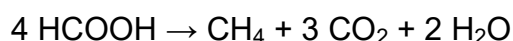
Le 6^{ème} ordre décrit, les *Methanocellales*, comprend des microorganismes hydrogénotrophes (Lyu and Lu, 2015). Dans le cas du 7^{ème} ordre des méthanogènes, les *Methanomassiliicoccales*, la production du méthane est obligatoirement dépendante d'une source externe d'H₂ pour réduire les composés méthylés en méthane. La notion de microorganisme méthanogène hydrogénotrophe, classiquement utilisée pour se référer aux microorganismes se développant sur H₂ + CO₂ doit maintenant être utilisée avec précaution car de plus en plus de souches décrites utilisent l'H₂ et les composés méthylés pour produire du méthane et sont donc par définition des hydrogénotrophes.

Les représentants cultivés de méthanogènes décrits dans les collections de microorganismes étaient divisés, jusqu'à présent, en trois catégories métabolique selon le type de substrats cataboliques utilisés pour synthétiser le méthane (Garcia et al., 2000) (figure 33). La mise en évidence récente d'une nouvelle voie nutritionnelle chez les *Methanomassiliicoccales*, c'est-à-dire l'oxydation des composés méthylés en présence d'hydrogène, représente une nouvelle voie métabolique chez les méthanogènes (Borrel et al., 2016).

➤ Le premier type de substrat utilisé est le CO₂, et correspond au groupe métabolique des hydrogénotrophes, selon l'équation:



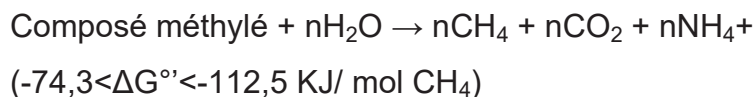
Le formate est également un substrat pour ce groupe métabolique:



$$(\Delta G^{\circ'} = -130,1 \text{ KJ/ mol CH}_4)$$

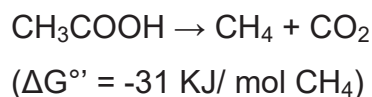
La plupart des méthanogènes connus sont des hydrogénotrophes qui réduisent le CO_2 en méthane, en présence d' H_2 comme donneur d'électrons (Liu and Whitman, 2008). En effet, les études basées sur les isotopes stables de l'hydrogène et du carbone montrent que la méthanogenèse hydrogénotrophe est la voie prédominante dans les sédiments marins profonds (Liu et Whitman, 2008). Beaucoup d'espèces hydrogénotrophes sont capables d'utiliser le formate comme donneur majeur d'électrons à la place de l' H_2 . Certaines espèces peuvent aussi utiliser des alcools secondaires, tels que le propanol, le butanol, ou le cyclopentanol comme donneurs d'électrons. Une faible portion des méthanogènes utilise aussi l'éthanol pour la synthèse de méthane.

➤ Le deuxième groupe métabolique concerne les méthanogènes utilisant des substrats constitués par des groupements méthyles ($-\text{CH}_3$), et comprend le méthanol, les méthylamines (mono, di et triméthylamines) et les méthylsulfures, selon l'équation:



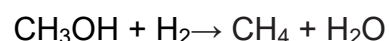
Les composés méthylés sont générés à partir d'osmolytes présents dans les bactéries marines, les algues, le phytoplancton et certaines plantes. Ces composés ne sont pas assimilés par les bactéries sulfato-réductrices et sont donc des substrats dits non compétitifs.

➤ le troisième groupe métabolique concerne les méthanogènes utilisant l'acétate pour synthétiser le méthane, selon l'équation:



L'acétate est un intermédiaire majeur dans la chaîne nutritive anaérobie, et environ deux tiers du méthane biogénique est dérivé de l'acétate.

➤ Le quatrième groupe métabolique concerne la nouvelle voie métabolique : la méthanogenèse méthylotrophe hydrogène dépendante (figure 34).



$$(\Delta G^{\circ'} = -112,5 \text{ KJ/ mol CH}_4)$$

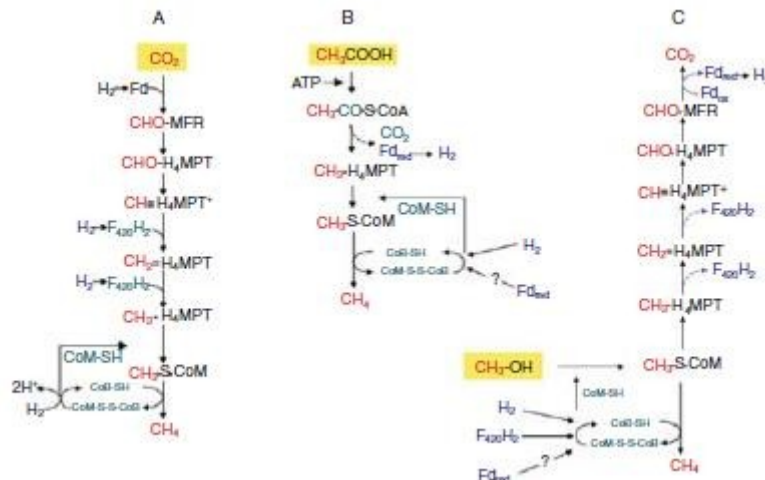


Figure 33: Schéma de 3 voies métaboliques de la méthanogénèse: à partir du CO₂ (A), de l'acétate (B) et du méthanol (C). Abréviations : CHO-FMR, N-formylmethanofuran ; CHO-H₄MPT, N5-formyltetrahydromethanopterin ; CH=H₄MPT, N5-N10methyl-tetrahydromethanopterin ; CH₂-H₄MPT, N⁵-N¹⁰methyl-tetrahydromethanopterin. (D'après Hedderich, 2006).

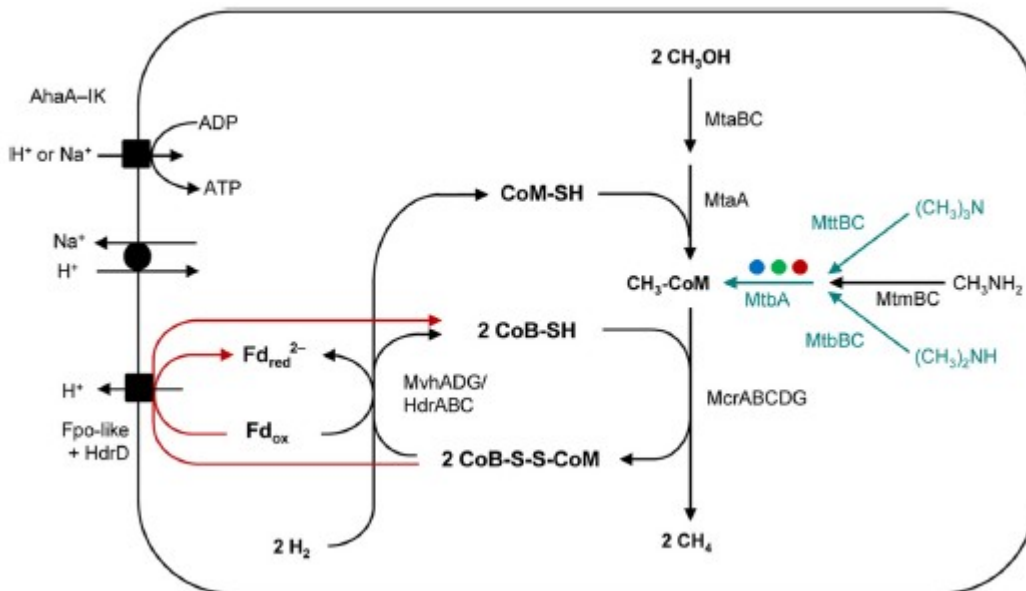


Figure 34: Représentation schématique de la 4ème voie de la méthanogénèse découvertes chez les membres de l'ordre des *Methanomassiliicoccales*. Les flèches noires indiquent les réactions enzymatiques présentes dans les génomes des *Methanomassiliicoccales* ; les flèches rouges indiquent la réaction proposée entre l'hétérodisulfure réductase (HdrD) et le complexe « Fpo-like » pour la régénération du Coenzyme B-SH. Les

flèches Bleu-vertes indiquent que les enzymes ne sont pas présentes dans les génomes étudiés. Point bleu *Methanomassiliicoccus luminyensis* ; vert *Methanomassiliicoccus intestinalis* ; rouge *Methanomethylophilus alvus* (d'après Lang et al., 2015).

La voie de la méthanogenèse est complexe, et nécessite des coenzymes uniques et des complexes enzymatiques liés à la membrane. Le métabolisme énergétique des méthanogènes comprend deux parties. Dans la partie oxydative de la voie de méthanogenèse, les coenzymes M (H-s-CoM) et le coenzyme B (H-S-CoB) sont oxydés en hétérodisulfures CoM-S-S-CoB par le CO₂, en acétate ou en composés en C1 réduits (CH₃-X) comme le méthanol ou les méthylamines, qui sont à leur tour réduits en CH₄. Dans la partie réductive, l'hétérodisulfure est réduit en coenzyme M et en coenzyme B, et le transport d'électrons est couplé à une phosphorylation (Thauer, 1998) (figure 35).

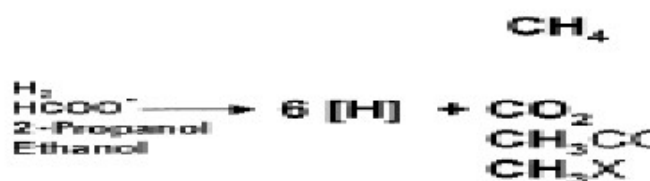


Figure 35: Parties oxydative et réductive de la méthanogenèse.

La dernière étape de la voie de méthanogenèse correspond à la réduction du méthyl coenzyme M (CH₃-S-CoM) avec le coenzyme B (CoB-SH) qui va libérer du méthane et produire l'hétérodisulfure coenzyme M et coenzyme B (CoM-S-S-CoB) grâce à la présence d'une méthyl coenzyme M réductase (MCR). Le méthane produit peut être vu comme un déchet, cependant l'hétérodisulfure produit est d'une importance centrale pour la cellule car la réduction de ce disulfure est couplée à la conservation de l'énergie. Cette conservation énergétique a été mise en évidence chez les espèces du genre *Methanosarcina*. Chez les *Methanosarcina*, les composants de la chaîne respiratoire sont fixés à la membrane et comprennent un transporteur la methanophenazine et une disulfure réductase (Hdr). La disulfure réductase (Hdr) va réduire le CoM-S-S-CoB en présence d'H₂ (figure 36).

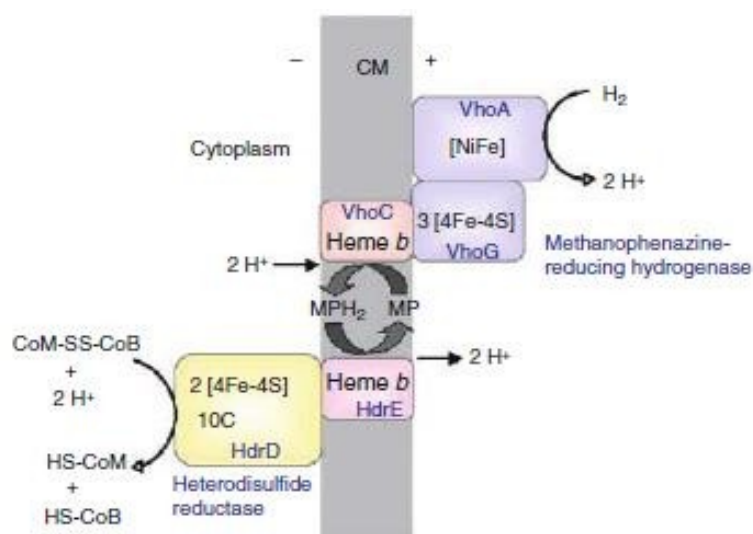


Figure 36: Représentation schématique de la chaîne respiratoire catalysant la réduction du CoM-S-S-CoB en présence d'hydrogène et de la méthanophénazine chez les espèces du genre *Methanosarcina*. (D'après Hedderich, 2006).

Chez les méthanogènes hydrogénotrophes, ordres des *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, la chaîne respiratoire catalysant la réduction du CoM-S-S-CoB est significativement différente. La méthanophénazine n'a pas été détectée. Chez les *Methanobacteriales*, et plus précisément chez *Methanothermobacter marburgensis*, l'hétérodisulfure réductase cytoplasmique qui forme un complexe catalytique avec une hydrogénase (NiFe) (Hedderich and Whitman, 2006) catalyse la réduction du CoM-S-S-CoB. Thauer et collaborateurs (2008) (Thauer et al., 2008) ont proposé l'existence d'un complexe enzymatique associant une hydrogénase la MvhADG, une hétérodisulfure réductase (Hdr) associée au co-facteur FAD pour catalyser la réduction du CoM-S-S-CoB et assurer la régénération de la ferrédoxine (figure 37).

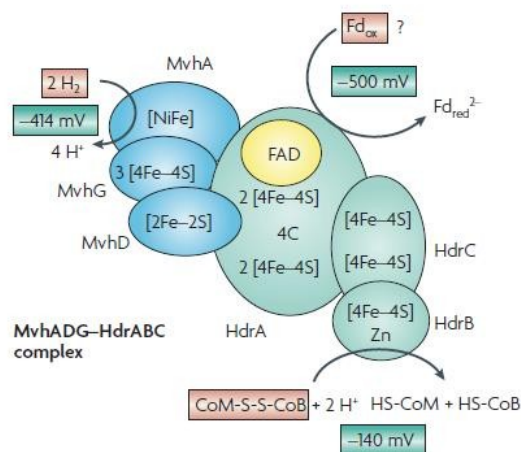


Figure 37: Schéma pour la réduction du CoM-S-S-CoB avec l'hydrogène en présence du complexe hydrogénase (MvhADG)-hétérodisulfure réductase (HdrABC). Ce complexe enzymatique couplerait la réduction endergonique de la ferrédoxine avec l'H₂ et la réduction exergonique du CoM-S-S-CoB avec l'H₂ par bifurcation d'électrons dans le co-facteur FAD. (D'après Thauer, 2008).

Kaster et ses collaborateurs (2011) ont mis en évidence la réaction enzymatique qui permet la réduction du CoM-S-S-CoB en présence de ferrédoxine et d'hydrogène (figure 38) (Kaster et al., 2011):



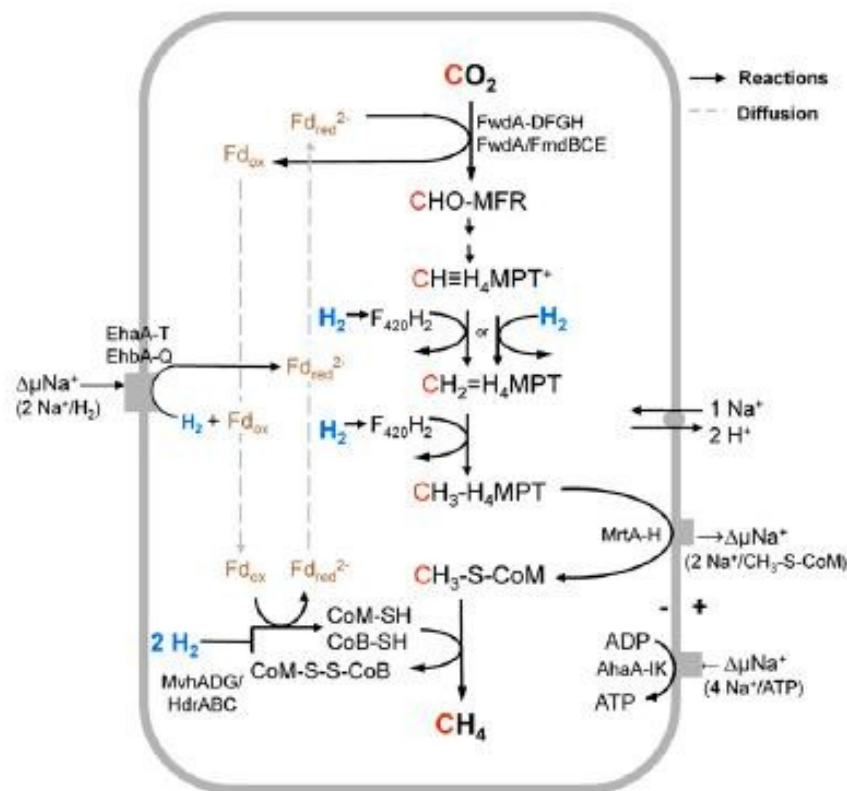


Figure 38: Réaction de la réduction du CO₂ avec 4 H₂ pour former du CH₄ chez *M. marburgensis*. La ferrédoxine réduite qui est nécessaire à la réduction du CO₂ en formylméthanofuran (CHO-MFR) est régénérée par la réaction catalysée par le complexe MvhADG/HdrABC. (Kaster et al., 2011).

Dans le 7^{ème} ordre des *Methanomassiliicoccales*, et donc dans la nouvelle voie métabolique des méthanogènes mise en évidence, la voie de Wood-Ljungdahl est absente ainsi que le complexe coenzyme M méthyltransférase (MTR). La méthanogénèse chez les *Methanomassiliicoccales* est restreinte à la réduction des composés méthylés en présence d'hydrogène (Brugère et al., 2014); (Dridi et al., 2012; Lang et al., 2015) (figure 39).

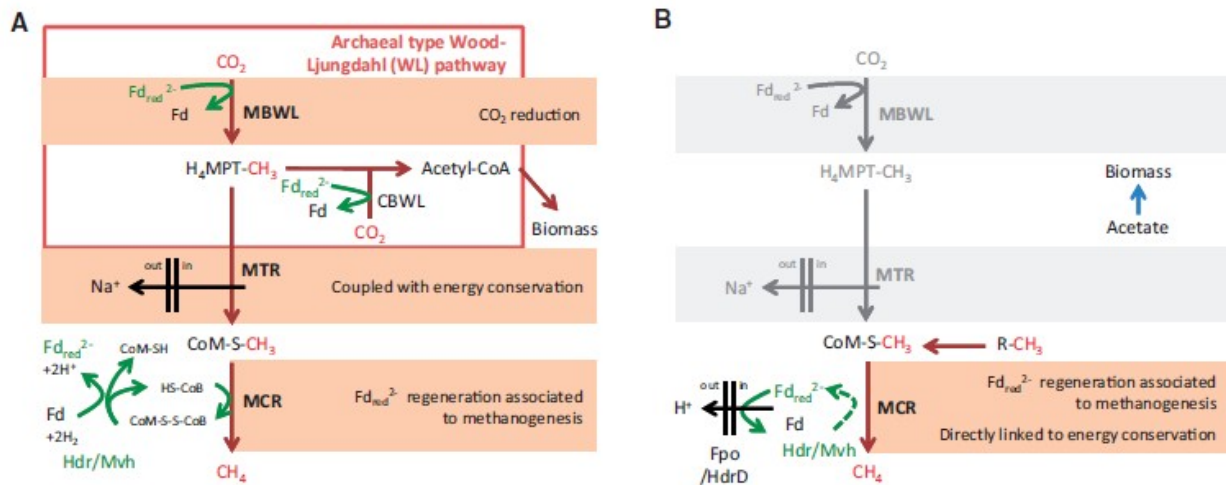


Figure 39: A) voie de fixation du CO_2 chez les méthanogènes de classe I et II en l'absence de cytochromes. B) Voie de la réduction des composés méthylés chez les *Methanomassiliicoccales*, les parties grisées sont absentes dans cet ordre. (D'après Borrel, 2016).

La conservation d'énergie dans cette nouvelle voie métabolique implique là aussi le complexe Mvh/Hdr pour la régénération de la ferrédoxine et la réduction du CoM-S-S-CoB. Une probable deuxième voie de conservation de l'énergie pourrait impliquer une hydrogénase F_{420}H_2 tronquée (Fpo) et une seconde hétérodisulfure réductase (HdrD), couplée à la génération d'un gradient chimioosmotique exploitable par une ATP synthase (Kroninger et al., 2016; Lang et al., 2015) (figure 40).

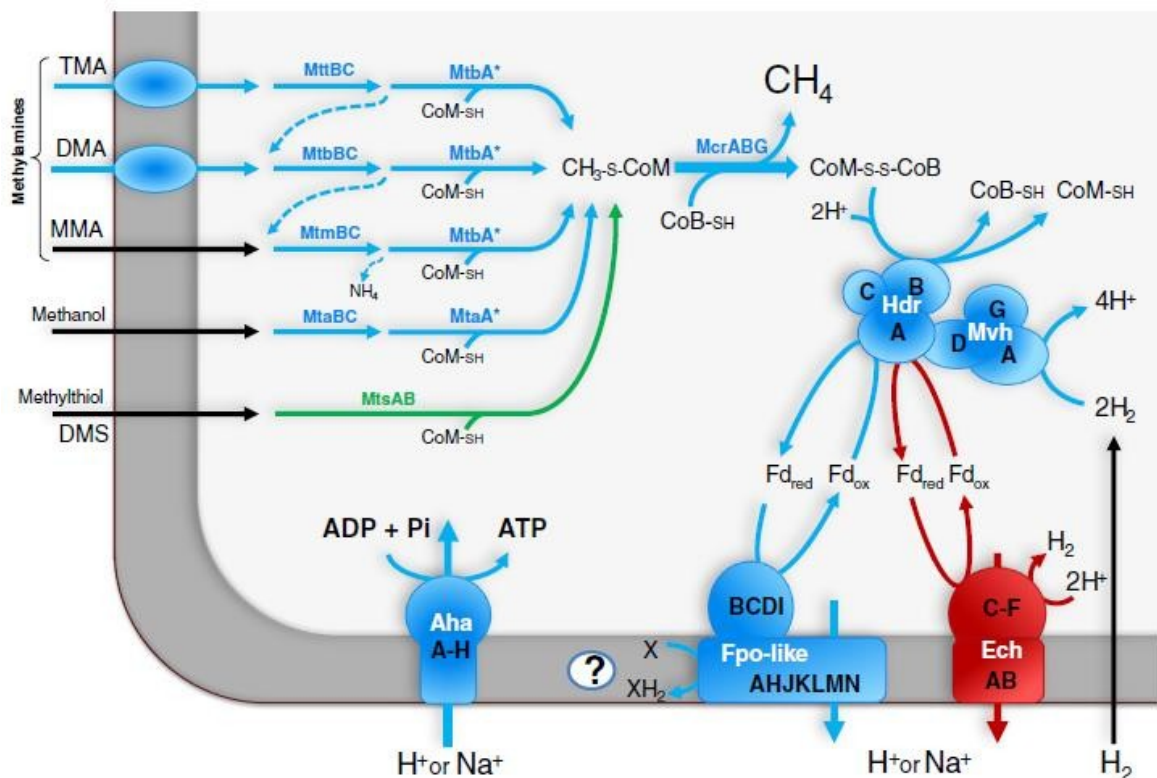


Figure 40: Voie de la méthanogénèse et conservation de l'énergie chez les représentants des *Methanomassiliicoccales*. En gras, le nom des protéines. En bleu, l'ensemble des voies et enzymes présentes chez les 3 génomes des *Methanomassiliicoccales*, en vert absent chez *M. intestinalis*, en rouge absent chez *M. alvus*. (Daprès Borrel, 2014).

Dans les 4 voies métaboliques décrites chez les méthanogènes, la présence du méthyl-coenzyme M réductase (MCR) est nécessaire. La présence d'une MCR, catalysant la dernière étape de la méthanogénèse, est une enzyme clé du processus et permet d'affirmer que celle-ci est une *Archaea* méthanogène. Ces MCR comprennent trois sous-unités α , β , et γ codées par les gènes *mcrA*, *mcrB* et *mcrG* (Reeve et al., 1997).

En raison de contraintes fonctionnelles, la sous-unité catalytique α de la MCR, codée par le gène *mcrA*, possède des domaines très conservés, et détectés chez tous les méthanogènes. Ainsi, les gènes *mcrA* sont hautement conservés ce qui en fait de bons candidats comme marqueurs moléculaires pour des études en écologie microbienne. De plus, les arbres phylogénétiques construits à partir du gène *mcrA* pour les méthanogènes présentent des topologies comparables à celles des arbres construits à partir des gènes codant l'ARNr 16S (Hales et al., 1996; Luton et al., 2002). Le gène *mcrA* qui code pour la MCR semble donc être un

marqueur spécifique approprié pour l'identification phylogénétique des méthanogènes dans des échantillons environnementaux.

V.5. La méthanogénèse en milieu hypersalé.

L'évidence de la production biologique de méthane dans un environnement hypersalé a été révélée pour la première fois à partir d'échantillons de saumure sous-marine dans le golfe du Mexique (Brooks et al., 1979). La réaction de méthanogénèse à la fois à partir de composés méthylés en l'absence d'hydrogène et d'acétate a été démontré dans un grand lac alcalin Soda (Nevada, USA) et aussi dans le grand Lac Salé (Utah, USA) (Oremland et al., 1982; Zeikus, 1983). Les études microbiologiques sur ces environnements hypersalés ont confirmé la présence de méthanogènes utilisant préférentiellement les composés méthylés comme substrats cataboliques (Liu and Whitman, 2008 ; Mathrani and Boone, 1985; Paterek and Smith, 1988; Zhuang et al., 2016a). L'ensemble de ces études indiquent que l'utilisation de substrats méthylés prédomine chez les microorganismes méthanogènes dans les environnements hypersalés par rapport à l'utilisation de l'hydrogène et de l'acétate. Dans les milieux hypersalés, la forte concentration en sulfate et l'affinité plus importante des bactéries sulfato-réductrices pour l'hydrogène surpasse les méthanogènes hydrogénotrophes et acétoclastes (Oremland et al., 1989).

Les substrats méthylés proviennent de la dégradation de la matière organique. Le méthanol par exemple est produit par dégradation de la lignine et de la pectine (Donnelly and Dagley, 1980; Schink and Zeikus, 1980). Les méthylamines et le diméthylsulfide (DMS) sont produits par oxydation d'osmolytes (i.e., glycine bêtaïne) et de diméthylsulfoniopropionate (DMSP), qui sont synthétisés à la fois par le phytoplancton et les microorganismes se développant dans les environnements hypersalés (Oren, 1990; Zhuang et al., 2016b).

Les espèces microbiennes méthanogènes halophiles qui ont été cultivées, caractérisées et déposées dans les collections de microorganismes sont regroupées en 4 genres : *Methanohalophilus*, *Methanohalobium*, *Methanosalsum* et *Methanocalculus*. Ces 4 genres appartiennent tous à la classe des *Methanomicrobia* et à l'ordre des *Methanosarcinales*, famille des *Methanosarcinaceae* pour le genre *Methanohalophilus*, *Methanohalobium*, *Methanosalsum* et

à l'ordre des *Methanomicrobiales*, famille des *Methanocalculaceae* pour le genre *Methanocalculus*.

Le genre *Methanohalophilus* comprend 4 espèces, *M. mahii* (Paterek and Smith, 1988), *M. portucalensis* (Boone et al., 1993), *M. halophilus* (Zhilina, 1983) and *M. levihalophilus* (Katayama et al., 2014). L'ensemble des espèces de ce genre sont strictement anaérobies et utilisent les substrats méthylés (MMA, DMA, TMA) pour produire le méthane. Ces espèces sont des halophiles modérées avec une croissance optimale entre 1,0 et 2,5 M de NaCl. Le tableau 3 synthétise les caractéristiques principales de ces espèces. Un arbre phylogénétique indiquant la position du genre *Methanohalophilus* est présenté dans la figure 41.

Tableau 3 : Caractéristiques des espèces du genre *Methanohalophilus*. 1, *Methanohalophilus levihalophilus* souche GTA13^T ; 2, *Methanohalophilus halophilus* souche Z-7982^T ; 3, *Methanohalophilus mahii* souche SLP^T ; 4, *Methanohalophilus portucalensis* souche FDF-1^T. MA, méthylamines ; ME, méthanol. (D'après Katayama, 2014).

Characteristic	1	2	3	4
Cell morphology	Cocci	Irregular cocci	Irregular cocci	Irregular cocci
Substrate utilization	MA	MA, ME	MA, ME	MA, ME
Temperature range (°C) for growth	20–40	18–40	>45	30–42
NaCl range (M) for growth	0.2–1.3	0.3–2.6	0.5–3.5	1.0–3.0
Optimum NaCl concn (M) for growth	0.4	1.2–1.5	2.0	2.2
pH range for growth	6.2–8.3	6.3–8.0	6.5–8.5	6.6–7.8
DNA G + C content (mol%)	44	44	49	43–44
Origin	Palaeo-seawater	Marine cyanobacterial mat	Saline lake sediment	Salt pond

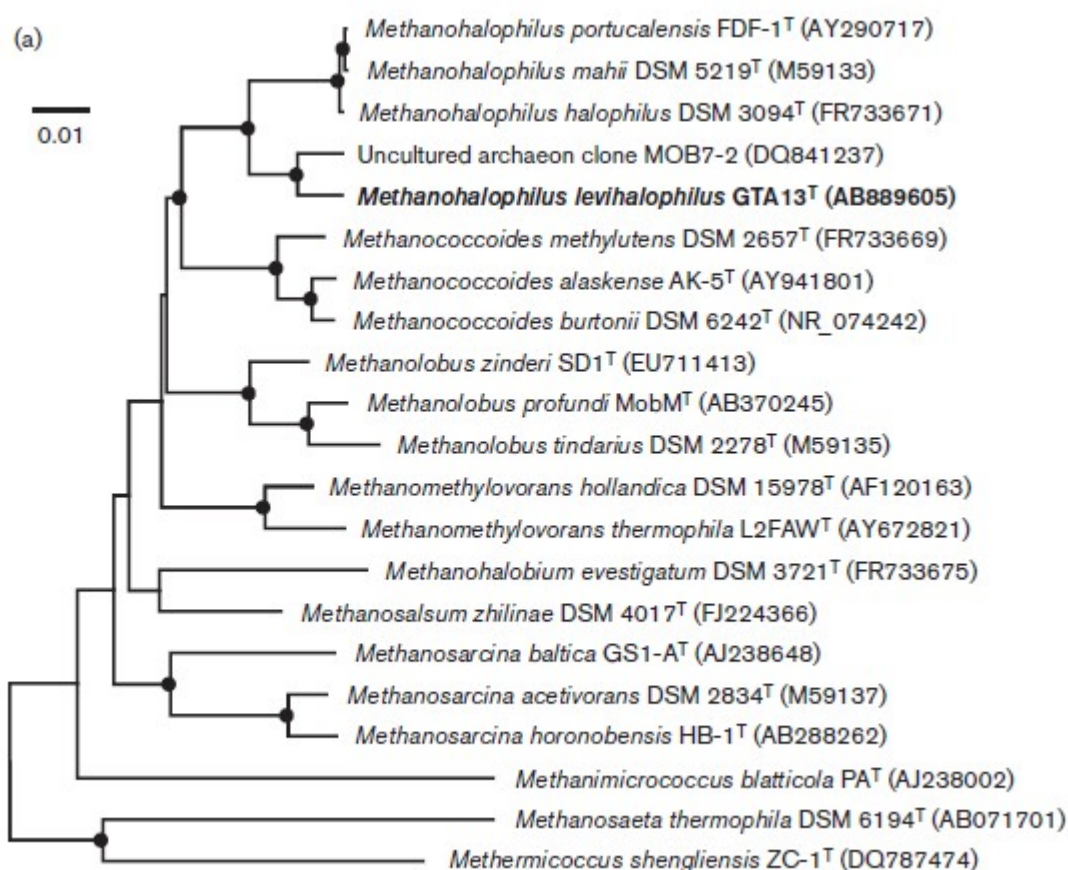


Figure 41: Position phylogénétique des espèces du genre *Methanohalophilus* basée sur les séquences d'ARNr 16S. (D'après Katayama, 2014).

Le genre *Methanohalobium* comporte une seule espèce *M. evestigatum* souche Z-7303 (Zhilina and Zavarzin, 1987). Cette espèce a été isolée de sédiments d'un lagon salé à Sivash (Ukraine). Ce genre se diffère des autres genres de la famille des *Methanosarcinaceae* par son aptitude à croître à des salinités extrêmes et représente le premier genre halophile extrême chez les méthanogènes. Son optimum de salinité est de 4,3 M de NaCl avec une température optimale de croissance de 50°C. Le méthane est produit à partir des composés méthylés (MMA, DMA et TMA). Le méthanol apporté à de faibles concentrations (< 5 mM) est aussi utilisé comme substrat pour la méthanogenèse.

Le genre *Methanosalsum* est composé de deux espèces, *M. zhilinae* souche Z-7938^T et *M. natronophilum* souche AM2^T (Mathrani et al., 1988; Sorokin et al., 2015). *M. zhilinae* a été isolé d'un lac alcalin hypersalé (Wadi el Natrum, Egypte) et *M. natronophilum* a été isolé d'un lac alcalin hypersalé de la steppe de Kulunda (Sibérie). Ce genre se caractérise par sa capacité à

croître à des pHs alcalins (pH optimal 9), à une température optimale de 43-45°C, à une salinité optimale de 0,6 M de NaCl, utilise les composés méthylés (MMA, DMA, TMA), le méthanol et le DMS pour produire du méthane.

Le genre *Methanocalculus* comprend 6 espèces mais seulement 2 espèces de ce genre, *M. halotolerans* souche SEBR 4845^T et *M. natronophilus* souche Z-7105^T, croissent en présence de concentrations en sels supérieures à celles de l'eau de mer (Ollivier et al., 1998; Zhilina et al., 2013). Ce genre est hydrogénotrophe et produit du méthane à partir de H₂/formate + CO₂. L'acétate est nécessaire pour l'anabolisme. La croissance optimale de ces deux souches est observée à 50 g.L⁻¹ de NaCl, à pH alcalin (pH 9) et à une température de 35°C.

VI. Approches culturelles.

La microbiologie a débuté avec l'observation au microscope de cellules bactériennes par Antonie van Leeuwenhoek en 1676, puis s'est construite autour des travaux de Louis Pasteur (fermentation, vaccination) et de Robert Koch (germes pathogènes). Les milieux de culture utilisés étaient des milieux qualifiés de riches car la quantité de carbone apportée dans le milieu était très importante. L'utilisation de ces milieux riches conduiront à la culture et à l'isolement des microorganismes à croissance rapide aux dépiments des microorganismes à croissance lente. La microbiologie s'est donc attachée à ses débuts à cultiver des organismes mésophiles, aérobies et hétérotrophes.

La plupart des microorganismes sont « résistants » aux approches culturelles dans les laboratoires. Il est communément cité que 99,0 à 99,9 % des microorganismes de l'environnement ne sont pas cultivés dans les laboratoires (Alain and Querellou, 2009).

Un des défis pour les microbiologistes est d'identifier les besoins en nutriments et de les fournir à une concentration appropriée afin de maintenir une croissance microbienne. Les microorganismes ont des besoins en nutriments différents en termes de qualité et de de quantité. Par conséquent la définition d'un milieu de culture adéquat reste une tâche très difficile. Réciproquement, l'utilisation de milieu à la composition bien définie va limiter la diversité et le nombre de microorganismes que l'on pourrait isoler de l'environnement naturel (Alain and

Querellou, 2009). Une majeure partie des microorganismes, particulièrement les microorganismes dits oligotrophes, bien représentés dans l'océan, sont des microorganismes à croissance lente. Il est donc nécessaire d'allonger les temps d'incubation pour cultiver et détecter ces microorganismes (Rappe et al., 2002).

L'utilisation de marqueurs moléculaires d'ADN environnementaux pour décrire la diversité d'un échantillon a été émise par l'équipe de Norman Pace (Olsen et al., 1986). Cette approche moléculaire indépendamment des étapes de cultures au laboratoire a révolutionné notre vision de la diversité microbienne. Le nombre de phyla incultivé, qui n'a cessé de croître depuis quelques décennies (Figure 42), a été qualifié de « microbial dark matter » (Marcy et al., 2007; Rinke et al., 2013).

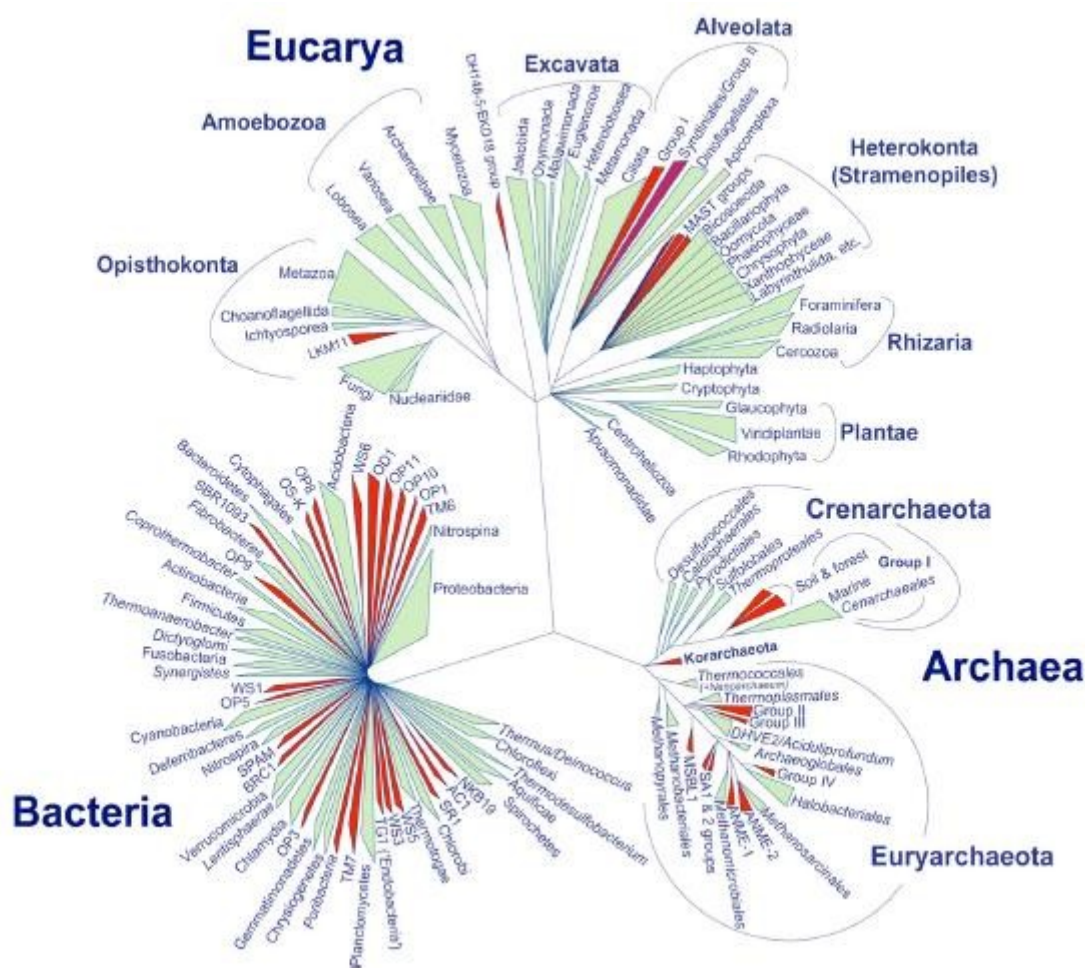


Figure 42: Arbre phylogénétique du vivant basé sur l'analyse des gènes ADNr 16S et 18S. Les triangles verts indiquent les phyla avec au moins un représentant cultivé, les triangles rouges les phyla sans représentant cultivé. D'après Lopez-Garcia and Moreira, 2008.

En 2008, plus de 100 phyla microbiens étaient reconnus, parmi lesquels plus de 70 ne possédaient pas de représentants cultivés (Figure 43) (Achtman and Wagner, 2008).

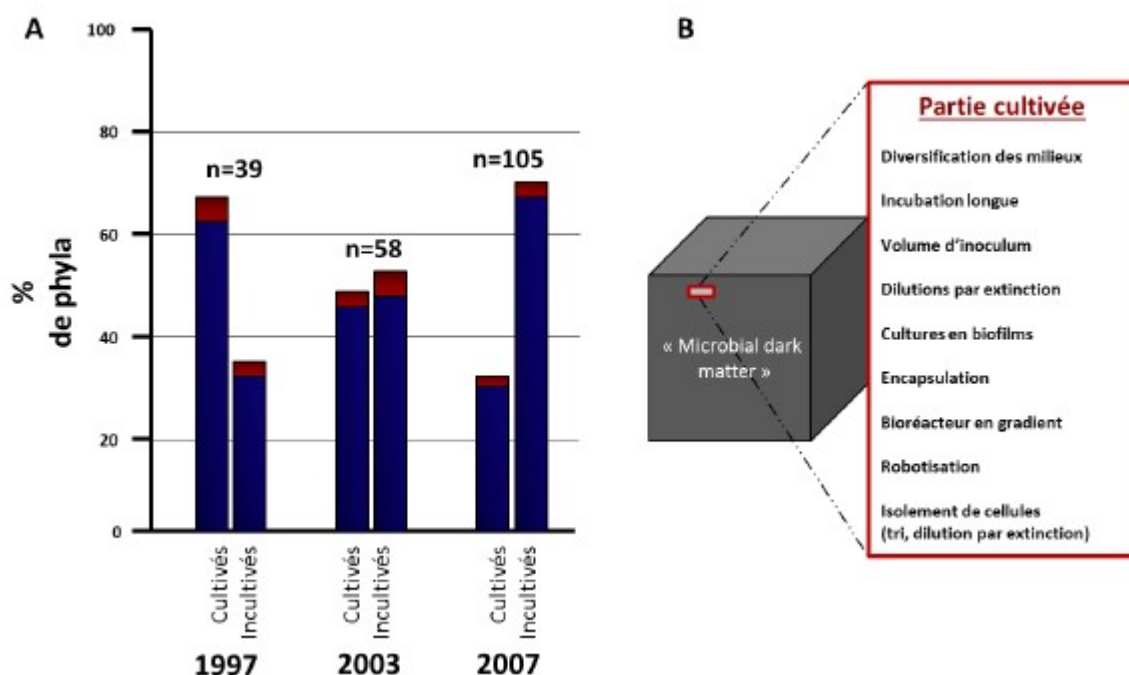


Figure 43: (A) Evolution du nombre de phyla ne comportant pas de représentant cultivé chez les *Bacteria* en bleu et les *Archaea* en rouge entre 1997 et 2007. Le chiffre n correspond au nombre de phyla identifiés. (B) Représentation des méthodes culturelles mises en œuvre pour augmenter la part de microorganismes cultivés. D'après la thèse de F. Gaboyer, modifié d'après Achtman & Wagner, 2008 ; Alain & Querellou, 2009.

Bien qu'elle soit délicate à quantifier, la diversité microbienne incultivée est très largement majoritaire. Cette majorité incultivée peut être expliquée par notre manque de connaissances des conditions physico-chimiques des habitats naturels et des interactions biotiques (syntrophie, commensalisme...) ou abiotiques difficiles à reproduire en laboratoire.

La prise de conscience de l'importance de cette fraction incultivée de la diversité microbienne a stimulé les efforts de culture et de développement de nouvelles approches (L'Haridon et al., 2016).

En microbiologie marine, le développement de la technique de culture de dilution à l'extinction tout d'abord introduite par Button (Schut et al., 1993) va permettre à l'équipe de

Giovannoni de cultiver la bactérie la plus abondante dans l'océan (Rappé et al., 2002); *Pelagibacter ubique* souche HTCC1062, appartenant au groupe des SAR11. Dès le début de l'essor des approches moléculaires en écologie microbienne des séquences proches de cette souche ont été observés dans l'environnement (Giovannoni et al., 1990). Malgré les nombreuses tentatives d'isolement de cette souche, celle-ci reste récalcitrante aux approches culturales jusqu'en 2002. Finalement, pour l'isoler, le milieu naturel a été utilisé comme milieu de culture de base dans lequel des sources de carbone ont été ajoutées à de très faibles concentrations. Ce n'est qu'en 2013 que ce groupe de recherche proposa un milieu de culture spécifique pour la croissance de *Pelagibacter ubique* (Carini et al., 2013). La conception du milieu de culture spécifique repose sur le séquençage du génome de cette souche et de ses potentialités génétiques. Les résultats du séquençage montrent par exemple la nécessité d'ajouter une source de soufre réduite pour la croissance, comme le DMSP ou la méthionine (Giovannoni et al., 2005). En effet, la bactérie la plus abondante dans l'océan n'utilise pas le sulfate comme source de soufre (Tripp et al., 2008). L'approche utilisant des séries de dilution dites à extinction a été introduite dans différents laboratoires avec plus ou moins d'améliorations mais cette technique a permis l'isolement de microorganismes présentant un intérêt écologique (L'Haridon et al., 2016). Le concept de cette technique repose sur l'inoculation d'un nombre très faible de cellules (entre 1 et 5) par puits dans le cas de microplaque (ou tubes de cultures) contenant un milieu naturel ou défini permettant aux microorganismes à croissance lente de se développer. Cette approche nécessite des temps d'incubation suffisamment importants. En effet, entre 20 et 24 semaines d'incubations sont nécessaires pour détecter des représentants du clade Sar11 (Song et al., 2009). Le dernier critère pour utiliser cette technique de manière optimale est de pouvoir abaisser les seuils de détection de la croissance bactérienne. Cette remarque est aussi valable pour l'ensemble des autres approches culturales. Le développement de système de filtration et de marquage par un agent intercalant de l'ADN dans le but du comptage en microscopie, ou *via* la cytométrie de flux ou encore la lecture automatique dans un lecteur de microplaques, permettent d'améliorer les seuils de détection (Rappé et al., 2002; L'Haridon et al., 2016).

Depuis une vingtaine d'années, des avancées ont été réalisées concernant les approches culturales. Bien que ces avancées aient permis de cultiver des microorganismes clefs à partir de l'environnement naturel, elles ne représentent pas une réelle révolution de nos approches de culture au laboratoire mais plutôt une amélioration des méthodes existantes. Pour les

environnements marins dans lesquels de faibles densités de cellules microbiennes s'y développent et communiquent, le choix d'un milieu oligotrophe est un prérequis. L'ensemble des avancées, améliorations et concepts nouveaux portant sur les approches culturelles sont présentées dans le chapitre « New approaches for bringing the uncultured into culture » (Annexe 1).

Pour autant, la majorité des microorganismes demeure réfractaire à toute mise en culture, d'où l'importance de se tourner aussi vers d'autres approches. On citera par exemple les approches de métagénomique et l'approche de type « Single Cells Genomics » (SCG). La métagénomique s'intéresse à l'étude d'un ensemble de génomes d'espèces (souvent différentes) appartenant à une même communauté microbienne. Cette approche va permettre d'une part de renseigner sur la diversité microbienne présente dans l'échantillon mais aussi de renseigner sur le potentiel fonctionnel de toute une communauté microbienne au niveau génomique. Une approche de métagénomique à partir d'un échantillon de plancton océanique a permis la découverte de gènes, dans le clade SAR86 (*Gammaproteobacteria*), codant pour la protéorhodopsine, une pompe à protons alimentée par l'énergie solaire connue alors uniquement chez les archées halophiles et les eucaryotes (Beja et al., 2000). Un des exemples majeurs d'approches de métagénomique à partir d'échantillons marins correspond au séquençage massif de l'ADN extrait de plusieurs centaines de litres d'eaux de la Mer des Sargasses (Venter et al., 2004). Cette étude a illustré la puissance de la métagénomique puisque parmi les 1,05.10⁹ séquences obtenues, 1800 espèces « génomiques » et 200 000 gènes codant pour des fonctions variées auraient été identifiés. De la même manière les approches ambitieuses de métagénomique portant sur un échantillonnage à grande échelle de l'océan mondial par Rusch et collaborateurs en 2007 (Rusch et al., 2007) ainsi que dans le cadre du projet Européen MicroB3 ont été entreprises. Au total, au cours de la journée OSD (Ocean Sampling Day), 191 sites ont été échantillonnés et traités par une approche de métagénomique (Kopf et al., 2015). La métagénomique fournit une vision globale des informations génomiques des différentes espèces d'une communauté permettant ainsi de spéculer sur les réseaux et les interdépendances métaboliques (syntrophie) entre espèces (du moins dans le cas de communautés peu complexes). Elle permet aussi d'acquérir des informations fonctionnelles putatives plus larges sur des organismes incultivés, liées à des processus cellulaires (mobilité, communication cellulaire, transports membranaires...) et moléculaires (régulation de l'expression du génome, réplication ou réparation de l'ADN...) variés.

Depuis quelques années, l'approche « Single Cell Genomics » (SCG) renseigne sur les potentialités fonctionnelles d'organismes incultivés à partir de l'étude de leur génome (Gawad et al., 2016 ; Blainey, 2013). Le principe général de cette méthode, décrit en figure 44, est d'isoler chacune des cellules d'un échantillon environnemental dans les puits d'une plaque de 96 ou 384 puits par tri cellulaire en cytométrie de flux ou plus rarement par micromanipulation ou utilisation de chambres d'isolement. Cette première étape de tri est suivie de l'amplification du génome par la technique de MDA (Multiple Displacement Amplification) et enfin de déterminer leur phylogénie par analyse du gène codant pour l'ARNr 16S. L'analyse des génomes amplifiés peut se faire soit de manière ciblée (par PCR ou microarray), soit de manière globale par séquençage total.

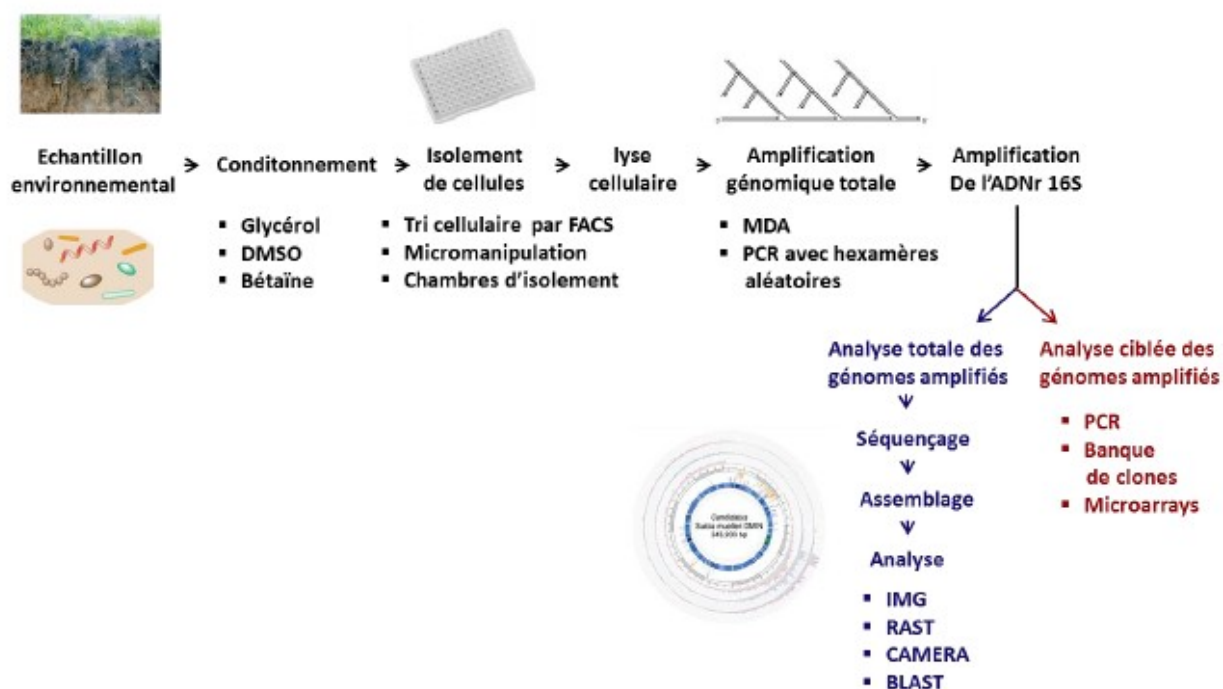


Figure 44: Principe du « Single Cell Genomics ». Après conditionnement des cellules extraites d'un échantillon environnemental, les cellules sont isolées individuellement dans les puits d'une plaque. L'ADN cellulaire est amplifié par MDA (Multiple Displacement Amplification) après lyse cellulaire. La phylogénie des cellules isolées est déterminée par analyse de l'ADNr 16S. Différentes analyses (séquençage, criblage) peuvent alors être effectuées sur l'ADN génomique amplifié.

Cette approche innovante permet de récolter de précieuses informations sur le mode de vie de microorganismes incultivés, souvent ubiquitaires et écologiquement importants. C'est par exemple par cette approche que le mode de vie d'une cellule de la division candidate TM7,

division connue uniquement des données moléculaires depuis 1996 (Rheims et al., 1996), a pu être connu (Marcy *et al.*, 2007). Le séquençage du génome de deux cellules appartenant à la candidate division TM7 révèle la capacité de ces cellules de métaboliser notamment des oligosaccharides et l'acide aminé arginine. En 2014, Soro et collaborateurs (Soro et al., 2014) parviennent à une culture axénique d'un représentant de cette division candidate TM7.

Problématiques et objectifs

Depuis la découverte de bassins hypersalés anoxiques profonds en Méditerranée en 1983, ces environnements extrêmes font l'objet de nombreuses études microbiologiques qui se sont intensifiées depuis une quinzaine d'années. Les approches moléculaires, les mesures d'activités, la quantification des abondances microbiennes dans l'halocline, ont révélé la présence de communautés microbiennes actives. L'analyse phylogénétique basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S réalisée sur ces communautés révèle la présence de nombreuses lignées d'incultivées qui sont regroupées principalement sous l'acronyme MSBL (Mediterranean Sea Brine Lake) division. Malheureusement le rôle et la fonction des microorganismes, appartenant à ces lignées phylogénétiques encore incultivées, en relation avec les caractéristiques et les contraintes de l'environnement des bassins profonds hypersalés anoxiques restent totalement hypothétiques. Les analyses physico-chimiques des saumures et de l'eau de l'halocline démontrent des concentrations élevées de méthane, d'hydrogène sulfuré et d'ammonium. Dans ces conditions, les processus microbiens de méthanogénèse et de sulfato-réduction sont mesurés par l'intermédiaire de mesures d'activités de sulfato-réduction et par le suivi cinétique de la production de méthane dans des incubations de saumures en présence des substrats présumés de la méthanogénèse. La lignée majoritaire dans les couches les plus salées des bassins et nommée MSBL1 (Mediterranean Sea Brine Lake groupe 1) est phylogénétiquement proche des lignées des *Methanomicobia*. Les premiers travaux suggèrent que les membres appartenant à la lignée MSBL1 seraient les producteurs du méthane dans ces bassins profonds hypersalés anoxiques. Une seconde lignée phylogénétique bactérienne d'importance, car distribuée de manière ubiquiste dans les DHABs, est nommée division candidate KB1. Des études récentes suggèrent qu'il existe probablement une relation trophique étroite entre les représentants de cette lignée bactérienne KB1 et les membres de la lignée archaéenne MSBL1. En effet, les auteurs ont proposés que les bactéries de la division candidate KB1 sont capables d'importer la glycine bêtaïne, soluté compatible qui ne serait pas seulement limité à la régulation de l'osmolarité mais pourrait également servir de source de carbone, d'azote et d'énergie. En effet, la dégradation de la glycine bêtaïne par les bactéries KB1 produirait la triméthylamine et l'acétate, qui sont les substrats privilégiés pour le processus de méthanogénèse. Aucun représentant des lignées MSBL1 et KB1 n'ayant été cultivé et isolé, cette hypothèse reste très spéculative. Récemment, une approche

innovante de « Single-Cell » à partir de cellules affiliées à la lignée MSBL1 renseigne sur l'absence des gènes qui codent pour l'ensemble des processus de la méthanogénèse dans les génomes.

Toutes ces hypothèses et résultats parfois contradictoires stimulent fortement les équipes de recherche qui s'intéressent à la diversité phylogénétique et fonctionnelle ainsi qu'aux adaptations physiologiques des communautés microbiennes dans les environnements extrêmes que sont les bassins profonds hypersalés anoxiques

Le laboratoire de microbiologie des environnements extrêmes (UMR6197) étudie la diversité microbienne des environnements extrêmes par des approches culturelles et moléculaires. Le laboratoire possède une solide expérience sur les environnements extrêmes tels que les sources hydrothermales océaniques profondes, les zones d'émissions de fluides froids au niveau des marges continentales, sur les forages profonds et les puits pétroliers.

Dans le cadre du programme Européen MAMBA (Marine Metagenomics for new Biotechnological Applications, 2009-2013, FP7-KBBE) l'expertise du laboratoire a fortement contribué à l'étude microbiologique des bassins profonds hypersalés anoxiques situés en Mer Méditerranée. Ce travail de thèse représente la première étude réalisée par le laboratoire LM2E sur cet environnement extrême caractérisé par de fortes salinités, l'anoxie et de fortes pressions. Les objectifs majeurs de ce travail de thèse avait pour but (i) d'identifier les principaux groupes métaboliques microbiens inféodés aux bassins profonds hypersalés anoxiques (DHABs) de la Mer Est-Méditerranéen et particulièrement les acteurs microbiens impliqués dans les processus dominants de méthanogénèse et de sulfato-réduction, (ii) d'isoler et caractériser de nouveaux microorganismes adaptés aux conditions hypersalées afin d'étudier leur physiologie, puis comparer le génome et la physiologie de méthanogènes halophiles du genre *Methanohalophilus* isolées de différents DHABs thalassiques *versus* athallasiques et (iv) de tenter d'enrichir et d'isoler des représentants halophiles des groupes d'incultivés représentatifs des DHABs (*i.e.* MSBL, KB1, ...), et étudier les adaptations aux fortes pression hydrostatiques et fortes salinités à partir de souches modèles.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes.

I. Campagnes océanographiques et matériels de prélèvements.

I.1. Campagnes de prélèvement.

Les échantillons de saumures ont été récoltés lors de 4 campagnes d'échantillonnage : la campagne *Middle* MAMBA en 2009, la campagne MAMBA 2010, *MICRODEEP* 2011 et *MICRODEEP* 2012. Ces campagnes d'échantillonnages ont été réalisées sur le navire de recherche italien URANIA (Figure 45). Les prélèvements d'eau de saumure ont été réalisés à l'aide de 24 bouteilles NISKIN de 12 litres chacune disposées en rosette sur un carrousel équipé d'une sonde CTD (Figure 45).



Figure 45: A gauche le navire de recherche Italien URANIA, à droite le carrousel avec les 24 bouteilles NISKIN et la sonde CTD située dans la partie basse.

Les bassins anoxiques hypersalés profonds, DHABs, (DHABs : Deep Hypersaline Anoxic Basin) Tyro, Kryos, Medee, Thetis, Urania, et L'Atalante ont été échantillonnés au cours de ces campagnes. Le tableau 3 indique les années de prélèvement sur les différents bassins.

Tableau 3: Liste des bassins échantillonnés au cours des différentes campagnes océanographiques.

	2009	2010	2011	2012
Tyro	X	X	X	X
Kryos	X	X	X	X
Medee	X	X	X	X
Thetis	X	X		X

Urania	X			X
--------	---	--	--	---

II. Conditionnement des échantillons.

II.1. Conditionnement des échantillons pour la culture microbienne.

Une fois les prélèvements effectués, le carrousel est remonté sur le pont du navire. Dans un premier temps, les mesures de salinités sont réalisées à l'aide d'un réfractomètre pour confirmer la salinité de l'eau échantillonnée dans chaque bouteille NISKIN. Une mesure au réfractomètre est réalisée au sommet et une deuxième dans la partie basse de la bouteille NISKIN. Ces 2 mesures nous indiquent la concentration et le gradient de salinité que nous avons échantillonnés.

Pour réaliser les prélèvements des échantillons d'eau en condition anaérobie, nous introduisons dans un premier temps un tuyau de gaz délivrant de l'azote au sommet de la bouteille NISKIN pour éviter toute oxygénation. Dans un deuxième temps, nous utilisons des flacons *Schott* de 1 litre ou de 500 ml, préalablement stérilisés au four pasteur et flushés à l'azote pour éliminer toute trace d'oxygène. Un tuyau en Masterflex est introduit dans l'orifice bas de la bouteille NISKIN permettant ainsi les prélèvements et l'autre extrémité est plongée au fond de la bouteille *Schott*. Une fois que le flacon *Schott* est rempli, on laisse s'écouler l'excédent de fluide quelques secondes puis le flacon *Schott* est obturé avec un bouchon en butyl préalablement percé d'une aiguille. Au moment de l'enfoncement du bouchon, l'aiguille facilite à la fois l'évacuation du surplus de fluide et l'enfoncement correct du bouchon butyl dans le flacon. Un capuchon rouge vissé sur le col de la bouteille maintient fermement le bouchon butyl en place.

II.2. Conditionnement des échantillons pour les analyses physico-chimiques.

Des prélèvements ont été réalisés afin de déterminer la composition en ions majeurs (cations et anions) et en molécules organiques dans les différentes eaux que nous avons conditionnées pour les approches culturales ou moléculaires. Nous avons prélevés 2 ml d'échantillon d'eau en triplicats. Les prélèvements de 2 ml ont été centrifugés à 10 000 rpm dans

des tubes Eppendorf. Le surnageant récupéré est transféré dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml. Les tubes sont immédiatement congelés à -20°C à bord du navire.

➤ Analyse en chromatographie ionique.

- Analyse de l'ammonium, méthylamines, choline, N,N-diméthylethanolamine, N-méthylethanolamine et ethanolamine.

Les échantillons de culture (1 mL) ont été centrifugés (15 min à 15000 g à 10 °C) puis dilués (1 :10, v/v) dans de l'eau déionisée (>18,2 MOhm; Milli-Q system®, Millipore™). L'analyse des cations (ammonium, méthylamines, choline, N, N-diméthyléthanolamine, N-méthyléthanolamine et éthanolamine) a ensuite été réalisée par un système de chromatographie ionique ICS-2000 (Dionex) équipé d'un suppresseur CSRS 300 4 mm, d'un détecteur de conductivité (maintenu à 35°C), et d'un passeur AS50 (Dionex, Camberley, UK). La séparation des cations a été réalisée en utilisant un éluant composé d'acide méthane sulfonique à un débit de 0,90 mL min⁻¹ sur une colonne Ionpac CS16 maintenue à 60°C. Le gradient utilisé était le suivant : 14 mmol L⁻¹ d'acide méthane sulphonic (MSA) pendant 30 min, suivit d'une augmentation de 5,33 mmol L⁻¹ MSA min⁻¹ à 46 mmol L⁻¹ (0 min), puis d'une baisse de 68 mmol L⁻¹ MSA min⁻¹ à 12 mmol L⁻¹ (8.5 min), d'une augmentation de 5,8 mmol L⁻¹ MSA min⁻¹ à 70 mmol L⁻¹ (5 min), et enfin d'une baisse de 11,2 mmol L⁻¹ MSA min⁻¹ à 14 mmol L⁻¹ (5 min). La limite de détection pour ces cations en utilisant cette méthode est de 0,2 µmol L⁻¹.

- Analyse de la bétaine et du diméthylglycine

Les échantillons de culture (1 mL) ont été centrifugés (15 min à 15000 g à 10 °C) puis dilués (1 :10, v/v) dans de l'eau déionisée (>18,2 MOhm; Milli-Q system®, Millipore™) selon le protocole décrit par Watkins et collaborateur (Watkins et al., 2014). Les cations (ammonium, bétaine, et diméthylglycine) ont ensuite été analysés par chromatographie ionique sans suppression (2) sur un système de chromatographie ionique ICS-2000 (Dionex) équipé d'un détecteur de conductivité (maintenu à 45°C) et d'un passeur AS50 (Dionex, Camberley, UK). La séparation des cations a été réalisée en utilisant un éluant composé d'acide méthane sulfonique (3 mmol L⁻¹) et acétonitrile (10 %) à un débit de 1,30 mL min⁻¹ et une colonne Ionpac CS16 maintenue à 50°C. La limite de détection pour la bétaine et la diméthylglycine en utilisant cette méthode est de 130 µmol L⁻¹.

II.3. Conditionnement des échantillons pour les approches moléculaires.

Une approche moléculaire a été réalisée uniquement à partir d'échantillons collectés du bassin Tyro. L'ensemble des approches moléculaires sur les autres bassins a été réalisé par le laboratoire de Michail Yakimov (CNR, Italie).

Les échantillons d'eau prélevés sont filtrés à l'aide d'une pompe péristaltique sur une membrane filtrante de 0,22 µm isolée dans une capsule filtrante (SteriVex-GS 0,22 µm Millipore Corp. Bedford, Mass). Dans le but de travailler sur les ARN, il est important de réaliser cette filtration très rapidement à la remontée du carrousel. En fonction de la densité de l'eau filtrée et de la concentration cellulaire, les volumes filtrés diffèrent d'un échantillon à l'autre. Après élimination de l'eau stagnante dans la capsule par injection d'air, les échantillons ont été congelés à -80°C.

II.4. Conditionnement des échantillons pour les dénombrements cellulaires totaux en microscopie à épifluorescence.

Le dénombrement cellulaire a été effectué sur les échantillons provenant du bassin Tyro. Un volume adéquat d'échantillon à analyser est préalablement fixé au formaldéhyde (7% final) puis incubé à 4°C, à l'obscurité pendant 2 heures. La fixation facilite la pénétration du marqueur fluorescent car elle augmente la perméabilité de la membrane cellulaire. Lorsque les densités cellulaires sont trop élevées (10 à 100 cellules par champs microscopique maximum), une série de dilution est réalisée dans du tampon PBS 10X (tampon phosphate salin; pour une solution 10X : 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ par litre, pH 7,4). L'échantillon fixé est ensuite filtré à l'aide d'une pompe à main, sur une membrane de 0,22 µm (Nucleopore Polycarbonate, Costar). Les filtres sont conservés à -20°C.

Au laboratoire, les filtres sont placés sur le verre fritté de l'appareil de filtration stérile. Le filtre est lavé une fois avec 10 ml de PBS 10X pour éliminer les dépôts salins auto-fluorescents

avant d'être déposé sur une lame de verre. Une goutte de solution de marquage SlowFadeGold (Invitrogen molecular probes) contenant le fluorochrome DAPI (4', 6'-diamidino-2-phényllindole) est déposé sur le filtre puis recouvert d'une lamelle. Après une incubation de 5 min à température ambiante et à l'obscurité, la préparation est observée au microscope à épifluorescence au grossissement X100, sous huile à immersion non fluorescente. Le comptage est réalisé à partir de 20 champs différents pris au hasard.

III. Approche culturelle traditionnelle.

Cette approche a été réalisée à l'aide d'un milieu d'enrichissement liquide distribué dans des flacons types pénicillines pour travailler en anaérobiose. En fonction de la salinité mesurée, les échantillons ont été classés en 3 groupes. Un premier groupe pour les échantillons ayant une salinité supérieure à 15 % (ces échantillons seront testés sur le milieu contenant 20% de NaCl), un second groupe pour des salinités comprises entre 8 et 15% (ces échantillons seront testés sur le milieu contenant 12% de NaCl) et un troisième groupe pour des salinités inférieures à 8% (ces échantillons seront testés sur le milieu contenant 6% de NaCl) (Table 4). L'ensemble des cultures d'enrichissements est réalisé en condition anaérobie à température ambiante (20°C).

Tableau 4: Liste des échantillons qui ont été utilisés pour les enrichissements dans des milieux de cultures composés de trois salinités différentes et le code attribué.

Bassin	Zone	Salinité (Réfractomètre)	Salinité milieu d'enrichissement		
			200 g/L	120 g/L	60 g/L
TYRO			code	code	code
Basin					
Niskin #11	Interface	19%	1	-	-

Niskin #11	Interface	16%	2	-	-
Niskin #11	Interface	11%	-	18	-
Niskin #9	Brine	35%	3	-	-
Niskin #21	Interface	5%	-	-	27
MEDEE Basin					
Niskin #16	Interface	19%	4	-	-
Niskin #16	Interface	17%	5	-	-
Niskin #19	Interface	12%	-	19	-
Niskin #19	Interface	9.6%	-	20	-
Niskin #24	Interface	8%	-	-	28
Niskin #24	Interface	5.7%	-	-	29
Niskin #7	Brine	>33%	6	-	-
Niskin #8	Brine	>33%	7	-	-
Niskin #9	Brine	>33%	8	-	-
Niskin #10	Brine	>33%	9	-	-
THETIS Basin					
Niskin #8	Brine	>33%	10	-	-
Niskin #9	Brine	30%	11	-	-
Niskin #19	Interface	26%	12	-	-
Niskin #20	Interface	8%	-	-	30
Niskin #9	Interface	19.2%	13	-	-
Niskin #9	Interface	15%	-	21	-
Niskin #9	Interface	12%	-	22	-
Niskin#9	Interface	7%	-	-	31
Niskin#9	Interface	5-6%	-	-	32

KRYOS Basin					
Niskin#16	Brine	42%	14	-	-
Niskin#16	Brine	30%	15	-	-
Niskin#16	Interface	18%	16	-	-
Niskin#16	Interface	12,4%	-	23	-
Niskin#16	Interface	9,1%	-	24	-
Niskin#24	Interface	5%	-	-	33
URANIA Basin					
Niskin #6	Interface	16%,	17	-	-
Niskin #17	Interface	6%			34
Niskin#17	Interface	10%	-	25	-
Niskin #17	Interface	15%	-	26	-
Niskin #20	Interface	4,4%	-	-	35

Préparation du
milieu de

culture de base:

Le milieu de culture utilisé est composé pour 1 litre de: NaCl (60, 120 ou 200 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3,45 g, NH_4Cl 1 g, KCl 1,5 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,14 g, 10 ml de solution d'éléments traces (Milieu DSMZ 141), Fe, $(NH_4)_2SO_4$ 2 mg, extrait de levure 0,2 g, acides aminés 0,2 g, $NaHCO_3$ 5 g, K_2HPO_4 0,14 g. Quelques gouttes de résazurine sont ajoutées pour colorer légèrement le milieu et contrôler le niveau redox du milieu. Le pH est ajusté à 6,8. Le milieu est ensuite chauffé, en flushant sous atmosphère N_2/CO_2 (80/20), jusqu'à ébullition. Le milieu est ensuite refroidit sous N_2/CO_2 (80/20). On ajoute 0,5 g de cysteine HCl. Le milieu est stérilisé par autoclavage : 121°C, 20 minutes avec 0,5 bar N_2/CO_2 (80/20). A la sortie de l'autoclave le milieu est flushé sous N_2/CO_2 (80/20) afin d'éliminer toute trace éventuelle d'oxygène. Une fois le milieu refroidit, on ajoute 10 ml de la solution de vitamines (milieu DSMZ 141) conservée sous N_2 .

➤ Préparation des milieux d'enrichissements.

Au milieu de base, différentes sources de carbones et d'énergies ont été rajoutées pour permettre la croissance des archées méthanogènes, de bactéries sulfato-réductrices, de bactéries fermentatives et de bactéries autotrophes. Au total, huit milieux différents ont été testés ; un milieu autotrophe/soufre (3 g.L⁻¹), autotrophe/nitrate (10 mM), et autotrophe/fer (FeOOH/FeCl₂). Dans les milieux autotrophes, la phase gaz est constituée d'un mélange de H₂/CO₂ (80/20). Les trois voies métaboliques méthanogènes ont été recherchées en ajoutant indépendamment comme substrat catabolique l'acétate 10mM, le triméthylamine 10mM ou le l'H₂/CO₂. Pour rechercher les bactéries sulfato-réductrices, deux milieux de culture ont été testés : un milieu avec acétate et lactate à une concentration de 10 mM chacun, et un deuxième milieu contenant du benzoate et du propionate à une concentration finale de 10 mM chacun. Enfin un dernier milieu dit hétérotrophe a été réalisé en ajoutant au milieu de base la tryptone (2g.L⁻¹) et le glucose 10 mM en présence de thiosulfate (10 mM) et de soufre (3 g.L⁻¹). L'ensemble des milieux sont réduits avant inoculation par l'ajout de 200 µL de Na₂S.9 H₂O 5%.

L'ensemble des étapes de préparation des milieux d'enrichissements a été réalisé dans une enceinte anaérobie (vinyl anaerobic glove chamber, société COY) comportant une atmosphère de N₂/H₂ (95/5 %) et un catalyseur au palladium. Le catalyseur au palladium en présence d'hydrogène réagit avec l'oxygène pour former de l'eau. L'eau produite est piégée par le silica-gel présent dans l'enceinte anaérobie. L'ensemble des solutions ou poudres a été stérilisé au préalable et introduit par l'intermédiaire du sas dans l'enceinte anaérobie 24 heures avant les expérimentations. L'ensemble des cultures ont été réalisées dans des flacons types pénicillines de 50 ml avec 20 ml de milieu d'enrichissement. Les flacons sont fermés avec un bouchon butyl (Bellco, Dutscher) et sertis avec une capsule en aluminium. L'ensemble de ces enrichissements ont été réalisés dès le retour au laboratoire et incubés à l'obscurité à une température proche de la température *in situ* de 16°C (température mesurée *in situ* 14°C). Le pH final est ajusté à 7 en faisant varier la pression en H₂/CO₂ (80/20) où N₂/CO₂ (80/20) dans l'atmosphère gazeuse. Les flacons pénicillines sont inoculés avec 1 ml d'échantillon brut. Au total, 280 fioles ont été inoculées selon cette première approche.

➤ Une deuxième série d'enrichissement en condition hétérotrophe a été réalisée en ajoutant d'autres substrats tels que dextran, choline, bétaine à une concentration de 2% finale pour les échantillons ayant une salinité supérieure à 8%. Nous avons également testé la quatrième et nouvelle voie métabolique de la méthanogénèse (méthanogénèse méthylotrophe hydrogène-dépendante) en incubant en condition autotrophe (sous HCO_2) et en présence de méthanol l'ensemble des échantillons. Dans cette seconde approche, 113 fioles ont été incubées dans les mêmes conditions que précédemment.

IV. Approche culturale haut-débit.

L'approche de culture haut-débit suivant la technique de dilution à l'extinction a été réalisée en condition aérobie selon trois salinités différentes (33, 100 et 200 g de NaCl) dans des microplaques 96 puits de 2,2 ml (Eppendorf ; reference: 0030502302) et fermées avec un couvercle en silicone (Eppendorf ; reference: 0030127579).

Des échantillons provenant des bassins MEDEE (235 g.L⁻¹ de sels) ; Tyro (Tyro 1, 80 g.L⁻¹ de sels ; Tyro 2, 310 g.L⁻¹ de sels), Thetis (236 g.L⁻¹ de sels) et Urania (160 g.L⁻¹ de sels) ont été testés.

➤ Préparation du milieu de culture (hétérotrophe aérobie):

Le milieu de culture utilisé est composé pour 1 litre de : NaCl (33, 100 ou 200 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 g, KCl 2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g, citrate de Na 3 g, extrait de levure 1 g, acides aminés 7,5 g. Le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de Tris-HCl pH 8. Le milieu est stérilisé par autoclavage (121°C pendant 20 minutes).

➤ Dénombrement des cellules cultivables dans le milieu de culture utilisé.

A l'aide d'un distributeur type Multipette (Eppendorf), 450 µl de milieu sont répartis stérilement dans les puits des microplaques sous un poste de sécurité de microbiologie de type II. Dans un premier temps le nombre de bactéries cultivables sur ce milieu a été quantifié dans une première expérience par la technique du nombre le plus probable (NPP) selon le protocole développé par Köpke (2005) (Köpke et al., 2005). Un aliquot de 50 µl d'échantillon bruts a été

inoculé dans les 450 µl de milieu de culture en série de dilution jusqu'à 10^{-6} (Figure 46). Les séries de dilution sont réalisées en duplicat.

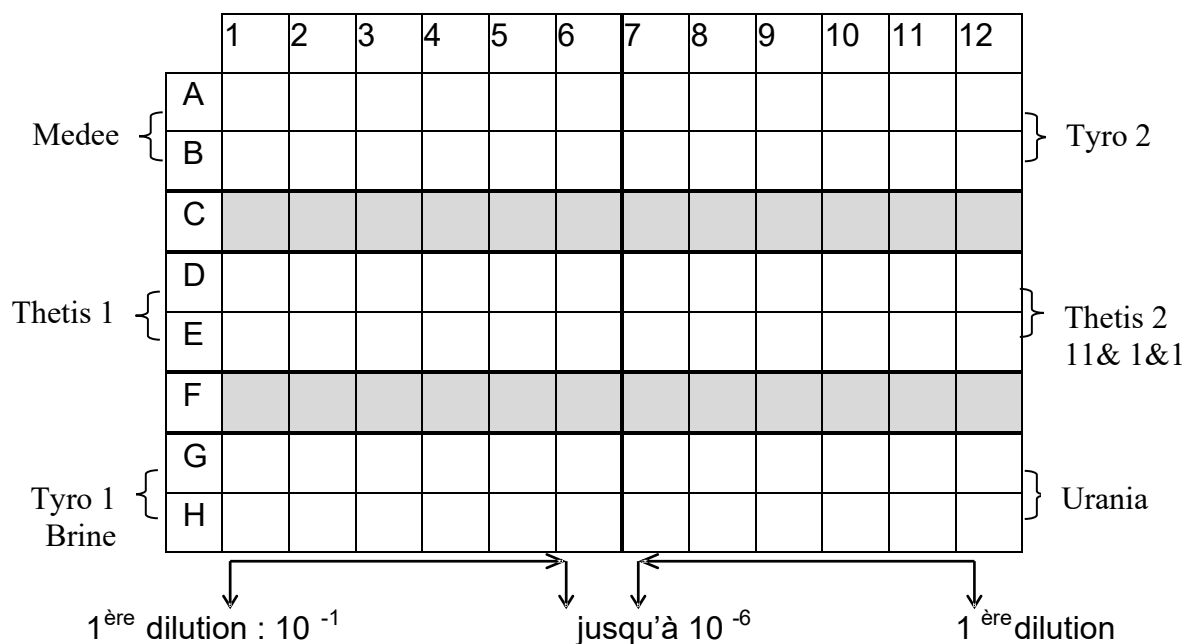


Figure 46: Représentation schématique de la microplaque 96 puits pour le dénombrement des cellules cultivables. Les lignes grisées correspondent aux puits non inoculés. Chaque échantillon est inoculé en cascade de dilution en duplicat.

Les 3 microplaques correspondant aux 3 salinités testées ont été incubées à 30°C pendant deux mois. La détection de croissance a été réalisée suivant le protocole ci-dessus.

- Technique de culture de dilution à l'extinction.

Une fois déterminé le nombre de cellules cultivables pour chaque condition de salinité testée, une plaque de culture contenant 500 µl de milieu de culture (par échantillon et par salinité) a été inoculé avec 0,1 cellule cultivable par puits. La colonne 6 de chaque microplaque est non inoculée pour s'assurer de la non contamination des microplaques. Les microplaques sont incubées à 30°C pendant deux mois. La révélation de la croissance bactérienne dans les puits est réalisée comme indiqué précédemment.

- Extraction d'ADN des puits positifs (présence d'une croissance bactérienne détectée).

L'ensemble des expérimentations est réalisé sous une hotte Captair (Erlab). 100 µl des cultures positives sont transférées dans une microplaque de type PCR (Polymerase Chain Reaction). Les microplaques sont centrifugées à 3700 rpm pendant 20 min. Après l'étape de centrifugation, 90 µl de surnagent sont éliminés. Puis 2 µl de tampon de lyse (Annexe 2) sont ajoutés. Les microplaques sont transférées dans un thermocycleur programmé pour un cycle de 10 min à 4°C, 1 min à 95°C, de 2min à 4°C. Les microplaques sont de nouveau rapidement centrifugées. On ajoute ensuite 2 µL de la solution neutralisante (Annexe 2), les microplaques sont centrifugées rapidement et incubées 3 min dans la glace.

L'étape d'amplification par PCR du gène codant pour l'ADNr 16S est réalisée en utilisant 1 µl de la solution finale présente dans les puits de la microplaque pour un mélange réactionnel de PCR d'un volume final de 35 µl. La vérification de la présence de produits d'amplification après l'étape de PCR est assurée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les produits PCR sont ensuite séquencés en utilisant l'amorce universelle antisens U1492R.

VII. Observation microscopique.

Pour suivre la croissance cellulaire, et vérifier l'état physiologique des cellules ou encore évaluer leur mobilité, l'utilisation de la microscopie optique s'avère très utile. La microscopie électronique permet de faire des observations plus fines comme la présence de flagelles, ultrastructure de la membrane, mesures de taille précises, etc.

➤ Microscopie optique

Il est commun d'effectuer des états frais afin de vérifier l'état physiologique ou simplement d'observer la croissance cellulaire à partir d'un échantillon donné. Dans ce but, une goutte de culture est déposée entre lame et lamelle pour être observée en microscopie à contraste de phase (Olympus BX60 ou CX40). Les observations sont réalisées avec objectifs x40, x60 et/ou x100 (immersion). Dans le cas des cellules pouvant potentiellement posséder le facteur F_{420} (méthanogènes et/ou méthanotrophes) qui leurs confèrent une autofluorescence bleu-vert naturelle lorsqu'il est excité sous UV, l'épi-fluorescence a été utilisée.

➤ Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET ou TEM pour *Transmission Electron Microscopy*) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon extrêmement fin. Les effets d'interactions entre les électrons et l'échantillon permettent l'obtention d'une image en 2 dimensions dont la résolution peut être inférieure à 0,1 nm (0,08). Ce protocole est adapté pour l'observation de cellules portant des pilis ou des flagelles.

Il est nécessaire d'avoir préalablement préparé une solution d'acétate d'uranyle à 2% (m/v) dans de l'eau distillée et filtrée sur 0,2 µm. On place la grille sur du parafilm (côté sombre au-dessus). On dépose 5 µL de suspension sur la grille pendant 5 minutes. On enlève le surplus avec du papier Whatmann® 3MM découpé en triangle. On dépose 5 µL de la solution d'acétate d'uranyle à 2% pendant 1 minute. On enlève le surplus avec du papier Whatman® 3MM. On place la grille sur un papier Whatman® 3MM sur lequel l'échantillon est identifié préalablement et déposé dans une petite boîte de Pétri. La grille est conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière. La grille est ensuite introduite dans le microscope (JEM 1400 (1200kV), JEOL) et observée.

VI. Isolement et caractérisation des isolats du genre *Methanohalophilus*.

VI.1. Milieu et conditions de cultures.

VI.1.1. Préparation du milieu de culture liquide.

Le milieu minimum utilisé contient par litre d'eau déionisée : 90 g NaCl ; 1,5 g de KCl ; 6 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g NH_4Cl ; 3,46 g de tampon PIPES ; 10 ml de solution d'éléments traces (milieu DSMZ 141) ; 0,14 g de KH_2PO_4 ; une goutte de résazurine à 1% ; pH 7. Le milieu est chauffé sous N_2 (100%) jusqu'à ébullition puis refroidit sous N_2 (100%). On ajoute 0,5 g de cystéine HCL. Le milieu est stérilisé par autoclavage : 121°C, 20 minutes, 0,5 bar N_2 (100%). A la sortie de l'autoclave, afin d'éliminer toute trace éventuelle d'oxygène, le milieu est flushé rapidement sous N_2 (100%). Une fois le milieu refroidit, on ajoute 10 ml d'une solution de vitamines (milieu DSMZ 141) conservée en anaérobiose sous une atmosphère de N_2 (100%).

Le milieu complet est composé du milieu minimum additionné de 0,5 g/L d'extrait de levure pour stimuler la croissance. Les cultures en conditions anaérobies ont été effectuées dans un volume final de 10 ml dans des tubes Bellco fermés hermétiquement par un bouchon bleu en butyl et sertis avec une capsule en aluminium. La distribution du milieu a été réalisée dans une enceinte anaérobie. Avant l'inoculation, chaque tube reçoit 100 μl de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 5% et 100 μl de TMA 2M. Le milieu complet est prêt pour l'inoculation.

VI.1.2. Préparation du milieu solide.

A partir des enrichissements positifs obtenus sur milieu destiné à rechercher les méthanogènes additionnée de TMA (Triméthylamine) nous avons entrepris l'isolement de 3 souches provenant de 3 bassins hypersalés différents (Tyro, Kryos et Thetis). Les isolements ont été réalisés sur milieu solide, l'agent gélifiant utilisé est l'agar noble.

200 ml de milieu complet 2X sont préparés suivant le mode opératoire indiqué ci-dessus. 200 ml d'eau déionisée sont portés à ébullition sous N_2 et refroidit sous N_2 . L'eau dégazée est transférée sous flux d'azote dans un flacon Schott de 500 ml auquel on ajoute 8 g d'agar noble. Les 2 préparations sont autoclavées, et flushées à l'azote à la sortie de l'autoclave. Les milieux sont maintenus dans une étuve à 60°C pendant 2 heures. On introduit les 2 préparations dans l'enceinte anaérobie et on mélange les 2 préparations. On ajoute 0,4 ml d'une solution de vitamines (milieu DSMZ 141), 4 ml de TMA 2M et 4 ml de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 5%. Ensuite 10 ml du mélange sont délicatement distribués dans les flacons de Wolfe posés à l'horizontal dans l'enceinte. Après 30 min, le milieu est solidifié. A l'aide d'une seringue et d'une aiguille, une goutte de culture en phase exponentielle de croissance est déposée au fond du flacon sur la gélose. A

l'aide d'une oëse stérile, la goutte de culture est ensuite striée jusqu'au sommet du flacon. Le flacon est ensuite bouché à l'aide d'un bouchon bleu en butyl et maintenu par un capuchon vissé dessus le col du flacon de Wolfe. Les flacons sont incubés à la verticale dans une enceinte à 30°C.

VI.2. Détermination des conditions optimales de croissance.

La température, le pH et la salinité sont trois paramètres qui influent sur la croissance. Afin de définir les optimums de croissance des 3 isolats appartenant au genre *Methanohalophilus* décrits dans cette thèse, la méthodologie qui a été appliquée est la variation de l'un des paramètres alors que les deux autres ont été maintenus constants. Toutes les expérimentations ont été effectuées en triplicats. Pour déterminer les conditions optimales de croissance (température, pH, salinité) nous avons réalisé un suivi de densité optique (DO) des cultures réalisées en tubes Bellco à l'aide d'un spectrophotomètre (Genesys 20, ThermoFischer) réglé sur une longueur d'onde de 600 nm.

➤ Température optimale de croissance.

La gamme de température de croissance pour chacune des 3 souches a été réalisée en inoculant une série de tubes contenant 10 ml de milieu complet liquide. Ensuite 0,5 ml d'une pré-culture fraîche en phase exponentielle de croissance a été utilisée comme inoculum. Les tubes sont ensuite incubés à des températures croissantes : 7, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45 et 50°C.

➤ Salinité optimale de croissance.

Une gamme de concentration en NaCl (la concentration des autres sels reste fixe) a été réalisée entre 0 et 300 g.L⁻¹ de NaCl avec un pas de 15 g de NaCl. Les cultures sont incubées à 30°C (température optimale de croissance).

➤ pH optimale de croissance

La croissance à différentes valeurs de pH a été déterminée par ensemencement d'un milieu à 90 g.L⁻¹ de NaCl, additionné de 20 mM de tampon : MES pH de 5 à 6; PIPES pH 6,5 et pH 7 ; HEPES pH 7,5; AMPSO pH 8 et 8,5 ; TRIS pH 9. Les incubations sont réalisées à 30°C (température optimale de croissance).

➤ Effet du MgCl₂ sur la croissance

Les 3 isolats ont été cultivés dans un milieu complet contenant 90 g.L⁻¹ de NaCl additionné de concentrations croissantes en MgCl₂ (de 0 à 3 M avec un pas de 0,5M).

➤ Utilisation du substrat carboné

La croissance à partir de différents substrats carbonés a été testée en utilisant le milieu minimum liquide additionné de la seule source de carbone à tester. Les substrats ajoutés ont une concentration finale de 20 mM : acétate, monométhylamine (MMA), diméthylamine (DMA), triméthylamine (TMA). Le diméthylsulfide (DMS) a été testé à 5 et 10 mM et le méthanol dans une gamme de 10 à 50 mM. Les cultures sont incubées à 30°C, pH 7 et une salinité de 90 g.L⁻¹ de NaCl. Les cultures présentant une croissance microbienne sont repiquées dans les mêmes conditions afin de certifier l'utilisation du substrat. Les cultures ne présentant pas de croissance sont testées une seconde fois dans les mêmes conditions.

VI.3. Croissance sous pression hydrostatique.

Les cultures sous hautes pressions hydrostatiques ont été effectuées dans des incubateurs hyperbares (HPHT, Top Industrie, France - réacteurs « maison » de l'ENS de Lyon). Dans un premier temps, des essais de culture sous pression hydrostatique ont été tentés dans des seringues en plastique à usage unique de 5ml (Terumo®). L'extrémité des seringues étaient équipées d'une aiguille piquée dans un bouchon bleu en butyl. Dans ces conditions de culture l'anaérobiose n'était pas maintenue. En effet à la sortie des réacteurs, la résazurine (indicateur redox coloré) contenue dans le milieu avait viré au rose, signe d'une oxydation du milieu. Dans un second temps, nous avons ensuite testé des seringues en verre étanches au gaz de 5ml

(Hamilton®). De la même façon, le milieu virait au rose. Nous avons donc opté pour la technique utilisée dans le laboratoire de John Parkes à Cardiff (Pays de Galles). Dans cette technique des flacons type pénicilline de 25 ml sont entièrement remplis avec le milieu de culture (pas d'atmosphère gazeuse) et inoculé dans l'enceinte anaérobie et bouchés avec un bouchon butyl. Les flacons sont sertis à l'extérieur de l'enceinte avec une capsule en aluminium. Le point crucial de cette expérimentation consiste à éliminer toute bulle de gaz dans le flacon. La pression hydrostatique dans le flacon sera exercée au milieu par l'intermédiaire du bouchon. Les flacons sont ensuite placés dans un incubateur rempli d'eau et celui-ci a été fermé hermétiquement (joint et fermeture à écrou). Une pompe hydraulique manuelle a été connectée au réacteur puis la pression a été augmentée dans celui-ci par ajout d'eau. La température était régulée automatiquement grâce à un couple composé d'une sonde et d'un thermostat alors que la pression était régulée par une valve manuelle de sortie (Figure 47). Des fioles témoins étaient placées dans une enceinte thermostatée à 30°C. Dès que la croissance est détectée dans les fioles témoins, l'expérience est stoppée et la concentration dans les différents flacons est mesurée à l'aide d'un cytomètre de flux.

Les études de la croissance des souches selon la pression d'incubation ont été réalisées en triplicats pour chaque pression à la température optimale de croissance mesurée plus haut (30°C). Les pressions hydrostatiques testées sont : 10, 20, 30, 40 et 50 MPa. Une fois déterminée la gamme de croissance sous pression hydrostatique, les croissances ont été testées à la température *in situ* (14°C) et à la pression hydrostatique optimale.

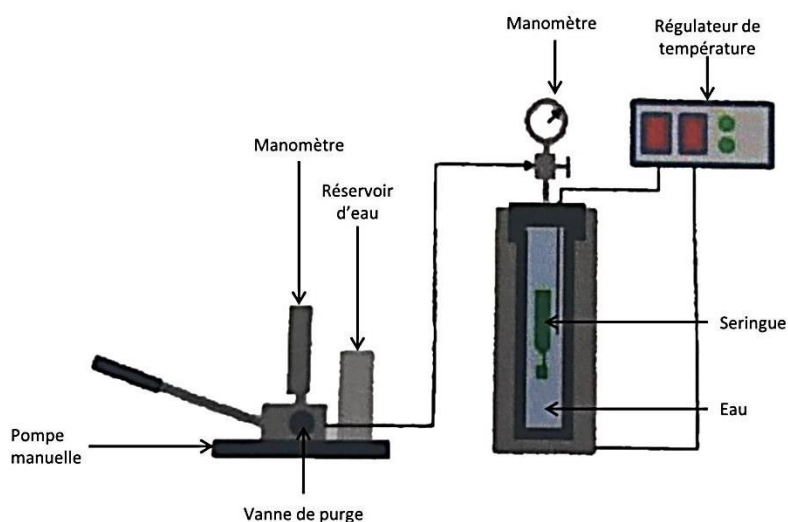


Figure 47: Schéma du système de culture haute-pression HPHT (Top Industries, France).

VII. Détermination de la croissance microbienne.

VII.1. Mesure de la densité optique par spectrométrie.

Dans quelques cas, les suivis de croissance ont été réalisés en suivant l'évolution de la turbidité des cultures, laquelle est proportionnelle à la densité cellulaire. Ces mesures de densité optique ont été effectuées sur des cultures réalisées dans des tubes Bellco (non rayés pour éviter les artefacts de lecture), à l'aide d'un spectrophotomètre visible (Genesys™ 20, ThermoScientific, réglé à une longueur d'onde de 600 nm et comparé à un contrôle ou « blanc » (même milieu de culture non inoculé).

VII.2. Détermination de la concentration cellulaire par cytométrie de flux.

Le plus souvent, les dénombrements ont été réalisés en cytométrie de flux (CyflowSpace®, Partec, équipé d'un laser 20 mW et de longueur d'onde 488 nm).

Les cellules ont été fixées au glutaraldéhyde (100 µL de glutaraldéhyde à 25 % dans 900 µL de culture), et conservées à -20°C avant d'être dénombrées. Les cellules fixées ont ensuite été diluées à l'aide de la base minérale du milieu de culture, au $1/10$ ou $1/1000$ selon la concentration cellulaire de l'échantillon; 1 µL de SYBRGreen I® (Invitrogen) a ensuite été ajouté à l'échantillon de culture dilué, puis les échantillons ont été comptés au cytomètre à un flux calibré de 10 µL par seconde. Les données concernant la diffraction de la lumière dans l'axe du laser et à sa perpendiculaire, ainsi que la fluorescence de l'ADN marqué par l'agent intercalant ont été traitées par le logiciel FloMax®software (Partec). Les cultures ont été dénombrées par rapport à un « template » développé pour la souche et les conditions de culture mises en œuvre.

VII.3. Détection de croissance dans des microplaques de Culture.

Le dénombrement des bactéries cultivables nécessite le marquage préalable des acides nucléiques (particulièrement l'ADN) à l'aide de l'agent intercalant SYBR Green I (Invitrogen) (Martens-Habbenha and Sass, 2006). Un aliquot de 100 µL de culture est réparti dans une microplaque 96 puits (UV Star, Greiner Bio One), puis 50 µL de SYBRGreen I (Invitrogen) dilué 1 000 fois dans du tampon TE (200 mM Tris-HCl, 50 mM sodium EDTA, pH 8) sont ajoutés dans chaque puits. Après 3 h d'incubation à l'obscurité, la fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (Infinite200Pro, TECAN) (excitation 485 $\pm$ 20 nm, émission 528 $\pm$ 20 nm). Les résultats sont exprimés en RFU (Unité de Fluorescence Relative). Les puits dont la valeur de fluorescence RFU est supérieure à la moyenne plus trois fois l'écart type ($RFU > \bar{x} + 3 \times s$) sont considérés positifs.

Le nombre de cellules par millilitre d'échantillon est obtenu à l'aide de la table de Mac Crady pour deux « tubes » par dilution, corrigé du facteur de dilution (Annexe 3).

VIII. Stabilité des ARNs en conditions hypersalées.

Suite aux travaux de Hallsworth (2007) sur la stabilité des ARNs d'une souche de *Marinobacter* sp. halotolérante, nous avons voulu analyser la stabilité des ARNs d'une souche halophile anaérobie modérée, codée souche SLHTYRO, et identifiée comme appartenant au genre *Methanohalophilus*.

Cinquante ml de culture en fin de phase exponentielle de croissance sont transférés dans l'enceinte anaérobie dans un tube Falcon. Le tube Falcon est ensuite centrifugé à 10 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. En condition anaérobie, le culot est repris dans 50 ml de milieu minimum contenant 300 g.L⁻¹ de NaCl. A cette salinité et sans présence de substrat carboné la souche SLHTYRO ne peut pas se développer. Afin d'évaluer l'intégrité des ARNs, nous avons prélevé 2 ml de culture au cours du temps : 0 jour, 1 jour, 7 jours, 15 jours, 21 jours, 30 jours et 45 jours. Les culots cellulaires ont été récupérés par centrifugation (10 min, 4°C à 14000 rpm). Les ARNs totaux sont extraits par la méthode au Trizol (Invitrogen) décrite plus bas et sont ensuite conservés à -80°C avant la rétro-transcription de l'ARNr 16S et l'ARN qui code pour l'enzyme *mcrA* (méthyl coenzyme M réductase).

IX. Méthode Moléculaire.

IX.1. Extraction d'ADN.

- Culture d'enrichissement et isolat.

Ce protocole détaille la méthode d'extraction d'ADN génomique à partir d'une culture d'archée ou de bactérie. Ce protocole a été utilisé sur les cultures d'enrichissements présentant un trouble visuel couplée à une observation microscopique généralement associé à une croissance cellulaire (Charbonnier et al., 1995).

Pour ce protocole, le culot cellulaire a été obtenu en centrifugeant 2 ml de culture dans un tube Eppendorf pendant 5 minutes à 10 000 rpm et 4°C. Le culot cellulaire a été repris dans 350 µl de tampon TE-Na (Tris-EDTA-NaCl). Dans le cas de paroi d'*Archaea*, 20µL de Sarkosyl 10%, 20µL de SDS 10%, 10 µL de Protéinase K à 20 mg/mL ont été ajoutés et les tubes ont été incubés à 55°C pendant 2 heures. L'extraction d'ADN a été réalisée en présence d'une solution de PCI (phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1) en ajoutant 400 µl de solution de PCI, suivi d'une agitation (sans vortex) durant 45 secondes. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 6 000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. La phase aqueuse supérieure est récupérée avec des cônes jaunes 200 µl. Dans le cas d'important débris au niveau de l'interface, l'extraction au PCI est répétée 2 fois. A la phase aqueuse sont ajoutés 400 µl de chloroforme, puis émulsionné sans vortexer durant 45 secondes. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 6 000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. La phase aqueuse supérieure est récupérée et 800 µl d'éthanol 100% glacé (-20°C) sont ajoutés suivie d'une agitation par retournement. Le culot d'ADN est récupéré par centrifugation à 14000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. La pelote d'ADN est nettoyée avec 0,5 mL d'éthanol froid à 70% en le resuspendant. Le culot d'ADN est récupéré par centrifugation à 14000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé. L'ADN est séché totalement au « speed vac » à une température moyenne pendant 10 minutes. L'ADN séché est ensuite repris dans 50- 100 µL d'EMQ stérile. L'ADN est conservé à 4°C.

IX.2. Extraction d'ADN pour le séquençage de génome.

Le protocole décrit ci-dessous est utilisé en modifiant les volumes et l'étape de récupération de l'ADN.

On centrifuge 4 X 50 ml de culture (en phase exponentielle de croissance = 10^8 cell/mL) dans un tube Falcon de 50 ml, 10 minutes à 10000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans 5 ml de tampon TE-Na. On ajoute ensuite 800 µL de Sarkosyl 10%, 800 µL de SDS 10% et 50 µl de RNase A à 50 mg.mL⁻¹. On mélange délicatement et on incube 1 heure à 37°C. On ajoute 500 µL de Protéinase K à 20 mg.mL⁻¹. On incube les tubes à 55°C pendant 3 heures. On agite lentement de temps en temps.

L'extraction d'ADN est réalisée en présence d'un mélange PCI (phenol/chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1). Pour cela on ajoute 8 ml de PCI (1 volume), puis on agite sans vortexer durant 45 secondes. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 6 000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. La phase aqueuse supérieure est récupérée avec une pipette de 10 ml stérile. L'extraction au PCI est répétée s'il y a beaucoup de débris au niveau de l'interface. Huit ml de chloroforme sont ajoutés suivi d'une agitation sans vortexer durant 45 secondes. Centrifugés à 6 000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. La phase aqueuse supérieure est récupérée. L'ADN est précipité par l'ajout de 16 ml d'éthanol 100% glacé (-20°C) et récupéré avec une pipette pasteur stérile. L'ADN est nettoyé en le plongeant une vingtaine de fois dans un tube Falcon de 15 ml contenant de l'éthanol 70%. L'ADN est séché rapidement à l'air libre. L'ADN séché est ensuite repris dans 300 µL d'EMQ stérile. L'ADN est conservé à 4°C.

Il est à noter que ce protocole a passé avec succès les critères de qualité défini par les différentes sociétés de séquençage.

IX.3. Extraction d'ADN/ARN sur les cartouches filtrantes (filtre Sterivex).

Le protocole utilisé est le protocole publié par Van der Wielen (2005). Les filtres sont extraits des cartouches filtrantes encore congelés et découpés rapidement en petit morceau. Les bouts de filtres sont ensuite introduits dans un tube Eppendorf. L'étape suivante consiste à extraire les acides nucléiques (ADN et ARN) selon le protocole décrit dans la section IX.1.

➤ Purification des extraits ARN

Afin d'éliminer toute traces d'ADN, les extraits sont traités avec une Dnase. Une partie du volume total d'extrait d'acide nucléique (ADN et ARN) est digérée à l'aide du kit Turbo Dnase (Ambion). Le mélange réactionnel est composé de 1 µl d'enzyme turbo Dnase à 2U/µl, 0,1 volume de tampon d'incubation 10X et de 1 à 20 µl d'extrait d'acides nucléiques. Le volume réactionnel est ajusté à 50 µl avec de l'eau ultra-pure certifié sans Rnase (MP Biomedical). Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 37°C au bain marie. L'enzyme est inactivé par l'ajout de 0,1 volume de tampon d'inactivation et incubé 5 min à température ambiante. L'ARN est isolé dans le surnageant par une centrifugation à 10 000g pendant 1 min 30. L'ARN purifié est visualisé sur gel d'agarose 1% et quantifié au spectrophotomètre Nanodrop avant rétro-transcription.

IX.4. Extraction des ARN et purification des ARNs à partir de cultures.

Cette méthode a été utilisée pour extraire les ARNs afin d'étudier la stabilité des ARNs en condition hypersalé à partir de l'isolat SLHTYRO, souche appartenant au genre *Methanohalophilus*.

Deux ml de culture sont centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min. Après l'élimination du surnageant, le culot est repris dans 1 ml de Trizol (Invitrogen). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 200 µl de chloroforme sont ajoutés. Le mélange est vortexé, puis incubé 2 min à température ambiante. La phase aqueuse et la phase organique sont séparées par centrifugation (14000 rpm, 15 min à 4°C). La phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube stérile. L'étape de précipitation est réalisée après l'ajout de 500 µl d'isopropanol, suivi d'une incubation de 10 min à température ambiante. Les ARNs sont culotés par centrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C) et lavés avec 1 ml d'éthanol 70%. Une nouvelle étape de centrifugation (14000 rpm, 10 min, 4°C) permet de culotter les ARNs. Le surnageant est éliminé, puis le culot est séché à l'aide d'un *speed-vac* (Savant) pendant 10 min à 30°C. A la fin le culot est repris dans 30 µl d'eau exempte de RNase puis conservé à -80°C.

➤ Purification des ARNs extraits sur colonne RNeasy (Qiagen).

La purification des ARNs a été réalisée sur des colonnes RNeasy en suivant scrupuleusement les indications du fabricant.

IX.5. Quantification des acides nucléiques.

- En routine, les ADNs et les ARNs sont quantifiés par mesure de leur absorbance en spectrophotométrie.

Les ADNs et les ARNs extraits ont été quantifiés à l'aide du NanoDrop ND1000 (ThermoScientific®) à partir de 2 µl d'extraits en suivant les recommandations du fabricant. La concentration en ADN et ARN est mesurée à 260 nm. Les rapports 260/230 et les rapports 260/280 permettent respectivement d'évaluer les contaminations en acides humiques ($R > 2$ pureté) et les contaminations protéiques ($R > 1,7$ pureté) appréciant ainsi la pureté des acides nucléiques extraits.

- Quantification des ADNs pour le séquençage génomique.

Les ADNs extraits sont quantifiés à l'aide du Qbit (Promega) pour répondre aux exigences des sociétés de séquençage. La quantification est réalisée en suivant scrupuleusement les préconisations du fournisseur utilisé (Promega).

IX.6. Amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR.

Afin d'éviter les contaminations potentielles, la préparation du mélange réactionnel de polymérisation en chaîne (PCR : Polymerase Chain Reaction) est effectuée sous une hotte Captair® bio Biocap DNA/RNA (Fisher Scientific Bioblock) et les pipettes sont traitées aux UV avant chaque utilisation. Pour chaque amplification, un témoin positif (matrice ADN de culture pure) ainsi qu'un témoin négatif (mélange réactionnel additionné d'eau) sont employés.

Les amplifications ont été réalisées sur la totalité des ADN extraits en utilisant des couples d'amorces spécifiques des domaines bactériens et archéens (Tableau 6). La taille attendue pour ces produits d'amplification est de l'ordre de 1400 pb et correspond à la quasi-totalité du gène (~ 1500 pb chez *Escherichia coli*).

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour les réactions de PCR, RT-PCR et PCR-DGGE. F : amorce Forward (sens) ; R : amorce Reverse (anti-sens). La position nucléotidique est basée sur celle de l'ARNr 16S d'*E. coli*. Les amorces notées en bleu possèdent à leur extrémité 5' une séquence de 40 nucléotides « GC-clamp » (5'– CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G– 3').

	Spécificité	Amorce	Séquence (5'- 3')	Référence	Taille du fragment amplifié
RT-PCR	Bacteria	E8F	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	Van der Wielen P. 2005	1484 pb
	Universelle	U1492R	GTT ACC TTG TTA CGA CTT		
	Archaea	A8F	CGG TTG ATC CTG CCG GA	Teske A. 2002	1484 pb
		A1492R	GGC TAC CTT GTT ACG ACT T		
PCR	Bacteria	E341F / U1492R	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Muyzer G. 1996	1151 pb
	Archaea	A341F / A1492R	CCT AYG GGG YGC ASC AGG CG	-	1151 pb
PCR-DGGE	Bacteria	341F-GC	CC TAC GGG AGG CAG CAG	Muyzer G. 1993	177 pb
	Universelle	518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG		
	Archaea	Saf 1-GC	CCT A(C/T)G GGG CGC AGC AGG	Nicol G. 2003	178 PB
		Saf 2-GC	CCT ACG GGG CGC AGA GGG		
		PARCH 519R	TTA CCG CGG C(G/T)G CTG		

Pour un volume final de 25 µL, le mélange réactionnel d'amplification se compose de : 20,15 µL d'eau milliQ stérile ; 2,5 µL tampon d'enzyme 10X (Promega) ; 0,5 µL mélange de dNTP 40 mM, 0,1 µL amorce sens 100 µM ; 0,1 µL amorce anti-sens 100 µM ; 0,15 µL *Taq* DNA polymerase 5 U/µL (Go*Taq*, Promega) ; 1 µL matrice ADN (50 ng.µL⁻¹). Les cycles de PCR sont indiqués dans le tableau 7.

IX.7. Amplification par RT-PCR du gène ARNr 16S.

Le protocole de RT-PCR choisi, « oneStep RT-PCR kit », fourni par QiagenTM, est un protocole en une étape qui regroupe les étapes de rétro-transcription et d'amplification dans un même mélange réactionnel.

Pour les réactions de RT-PCR, un mélange réactionnel (50 µL final) contient une quantité optimale d'ARN purifié, 0,6 µM de chaque amorce, 2 µL de « Qiagen One Step dNTP mix » à 10 mM, 10 µL de « Qiagen One Step RT-PCR Buffer 5 X » et 2 µL de Qiagen One Step Enzyme Mix ». Les réactions d'amplifications se déroulent selon les cycles résumés dans le tableau 7.

IX.8. Amplification « nichée » par PCR en vue de l'analyse en DGGE.

Les ADNrc 16S obtenus après amplification par PCR servent de matrices dans une seconde PCR dite « nichée » utilisant des couples d'amorces ciblant la région variable V3 de l'ADNr 16S. Les couples d'amorces 341F-GC et 518R pour l'étude des *Bacteria*, et le mélange Saf 1/Saf 2 et Parch 519R pour l'étude des *Archaea* ont été sélectionnés (Tableau 7). Les amorces sens utilisées possèdent en 5' une séquence de 40 nucléotides GC (GC-clamp ou queue GC) empêchant la dénaturation totale des fragments d'ADN au cours de la migration électrophorétique.

La composition du mélange réactionnel pour la PCR-DGGE est identique à celle utilisée lors des PCR classiques décrites plus haut, à l'exception des amorces Saf1-GC et Saf2-GC utilisées en mélange selon le rapport 2:1 (Nicol et al., 2003). Les cycles d'amplification utilisés pour la PCR-DGGE sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Amorces et cycles des amplifications par PCR, RT-PCR et PCR-DGGE.

	Spécificité	Couple d'amorce	Dénaturation	Cycle PCR	Nombre de cycles	Elongation finale	Référence
RT-PCR (1500pb)	Bacteria	E8F / U1492R	30 min à 50°C 15 min à 95°C	1 min à 94°C 1 min 30 à 55°C 2 min à 72°C	30	6 min à 72°C	Teske A. 2002
	Archaea	A8F / A1492R					
PCR (1000pb)	Bacteria	E341F/ U1492R	5 min à 94°C	1 min à 94°C 1 min 30 à 55°C 2 min à 72°C	30	6 min à 72°C	Muyzer G. 1996
	Archaea	A341F / A1492R					
PCR-DGGE (176pb)	Bacteria	341F-GC 518R	5 min à 94°C	1 min à 94°C 1 min de 65 à 55°C 3 min à 72°C	20	30 min à 72°C	Muyzer G. 1993, 1996
				1 min à 94°C 1 min 55°C 3 min à 72°C	15		
	Archaea	Saf1/Saf2-GC PARCH 519R	5 min à 94°C	1 min à 94°C 1 min de 65 à 55°C 3 min à 72°C	20	30 min à 72°C	Nicol G. 2003
				1 min à 94°C 1 min 55°C 3 min à 72°C	5		

IX.9. Clonage des produits d'amplification PCR.

A partir des produits d'amplifications obtenus à partir des matrices ADN extraites des cultures d'enrichissements positives, une étape de clonage a été réalisée avant le séquençage. Pour les isolats, les produits d'amplification PCR sont directement envoyés au séquençage (Beckman Coulter Genomics).

Le vecteur utilisé pour le clonage est le pGEMT easy vector (Promega), selon les recommandations du fournisseur. Les cellules compétentes (X-gold, Stratagène) sont transformées avec les fragments d'intérêt et étalées sur milieu solide. Le milieu solide est additionné de 1 mL d'IPTG (0,5 M), 1 mL de X-Gal (80 mg/ml) et 1 mL d'ampicilline (100 ng/ml). Les colonies blanches sont ensuite repiquées dans le milieu SOC liquide et incubées à 37°C pendant une nuit. Les plasmides contenant les fragments d'intérêts ont été extraits et purifiés à l'aide du Kit de GenJet Mini prep (ThermoScientific) selon les instructions du fournisseur. Les gènes d'intérêt clonés (ADNr 16S, *McrA*, ...) sont amplifiés par PCR à l'aide des amorces M13F et M13R. Les produits d'amplification ont été envoyés à Beckman Coulter Genomics pour les séquencer selon la méthode de Sanger.

IX.10. Electrophorèse d'ADN.

Les produits d'amplification obtenus par PCR et RT-PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose (Eurobio) 0,8 % dans du TAE 1X (pH 8 ; 40 mM Tris-base, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA). Le gel est coloré au BEt (bromure d'éthidium) 1 µg/ml. La migration s'effectue en général sous une tension de 100 V pendant 45 min. Après migration des produits d'amplification en présence d'un marqueur de taille, le gel est photographié sous une table UV (Avantec).

IX.11. Analyse des produits de PCR par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

La diversité moléculaire dans l'halocline du bassin Tyro à partir des ARNs extraits des filtres a été analysée par la technique DGGE.

Les produits d'amplification sont additionnés de tampon de charge (bleu de Bromophénol concentré 5X) puis chargés et séparés sur un gel de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Les profils génétiques en DGGE sont obtenus à l'aide du système D GENETM Denaturing Gel Electrophoresis System (Biorad Laboratories). Cette technique d'électrophorèse permet de séparer des fragments de même taille en fonction de leur séquence nucléotidique. La migration des produits d'amplification, à température constante (65°C), est réalisée dans un gel de polyacrylamide à 8% contenant un gradient linéaire de formamide et d'urée. Les conditions 100% dénaturantes sont définies par 40% de formamide (v/v) et 7 M d'urée.

Dans un premier temps, un gel dénaturant à 20-80% est réalisé sur l'ensemble des amplifications dans le but de déterminer les conditions dénaturantes optimales pour chaque échantillon.

➤ Préparation du gel dénaturant

Les plaques en verre sont lavées à l'aide de détergent et d'éthanol puis celles-ci sont assemblées en « sandwich » avec des « spacers » d'un millimètre d'épaisseur ajustées de chaque côté. L'étanchéité du montage est vérifiée avant de couler le gel.

Une première couche de solution d'acrylamide 0% dénaturante (solutions dénaturantes, annexe 4) est coulée afin de constituer le fond du gel. Cette couche est polymérisée par l'ajout de 10 μ L de persulfate d'ammonium 10% (APS ; Biorad Laboratories) et de 1 μ L de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine ; Biorad Laboratories).

Le gradient dénaturant est réalisé à l'aide d'un « gradient maker » (Hoefer SG30, Amersham Biosciences) relié à une pompe péristaltique. Les deux colonnes formant le système sont remplies de 12 mL de solution dénaturante, 60 μ L d'APS 10 % et 6 μ L de TEMED. Le mélange des solutions s'effectue sous agitation au moment de l'ouverture du robinet de jonction. Ainsi la solution la plus dénaturante est diluée par la solution la moins dénaturante. Le gel est coulé grâce à la pompe péristaltique réglée pour fournir un débit constant de 5 mL/min et à une aiguille placée entre les plaques. Enfin, la surface du gel est aplanie en ajoutant 2 mL de butanol saturé en eau.

Après environ 1h de polymérisation à température ambiante, le butanol est éliminé et la surface du gel est rincée plusieurs fois à l'eau distillée. Le peigne (prévu pour former 20 puits de dépôt) est ensuite inséré entre les plaques, et le gel de concentration (« stacking gel ») est coulé (5 mL d'acrylamide 0 %, 50 μ L d'APS 10 % et 5 μ L de TEMED).

La cuve d'électrophorèse est remplie de 7 L de tampon de migration TAE 1X (Tris 40 mM – pH 8, acide acétique 20 mM, EDTA 1mM – pH 8) puis préchauffés à 60°C. Avant d'effectuer les dépôts, les puits sont rincés avec le tampon de migration pour éliminer l'excès d'urée et d'acrylamide qui pourrait gêner la migration.

➤ Dépôt, migration et révélation

Afin de comparer la présence/absence et l'intensité des bandes de plusieurs profils électrophorétiques correspondant aux différents échantillons, environ 300 à 500 ng d'ADN sont chargés dans chaque piste. Les produits PCR sont mélangés avec du tampon de charge puis chargés sur le gel DGGE.

La migration est composée d'un premier « run » (30 V, 15 min), puis d'un deuxième « run » réglé à 80 V pendant 15 h. En fin de migration, le gel est coloré dans un bain de SYBR Gold (Invitrogen), dilué 10 000 fois dans du tampon TAE 1X, pendant 15 min à l'obscurité, puis rincé dans un bain de tampon TAE 1X pendant 30 min. La visualisation du gel est réalisée au scanner

9400 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences) en mode fluorescence, excitation 488 nm, émission 520 nm.

X. Séquençage des génomes.

X.1. Méthodes de séquençage.

Nous avons utilisé 3 techniques de séquençage différentes pour tenter de circulariser les génomes. Le séquençage suivant la technologie de Pacific Biosciences « PacBio » qui a été réalisé à Toulouse chez Genotoul (France), le séquençage suivant la méthode Ion Torrent effectué à Lyon (France) et la méthode Mate-pair par Beckman Coulter Cogenics (Royaume Uni).

➤ PacBio

La technologie de Pacific Bioscience ou « PacBio » utilise la méthode SMRT c'est-à-dire Single Molecule Real-Time Analysis ou séquençage en temps réel de molécule unique. Cette technologie utilise le marquage par fluorescence des nucléotides ajoutés aux brins d'ADN. L'ajout d'une base est détecté en temps réel au cours du séquençage.

L'atout principal de cette méthode est la possibilité de lire des séquences allant jusqu'à 20000 bases, ce qui a pour conséquences de diminuer le nombre d'erreurs et de réduire le taux de couverture (bases détectées par redondance / nombre de bases à séquencer).

Des nucléotides marqués par fluorescence sont intégrés dans l'ADN en cours de réplication, un marqueur pour chaque nucléotide, soit 4 marqueurs différents. Les cavités du chipset appelées « zero mode waveguides » vont capter les photons émis par la fluorescence lors de l'intégration de la base. Un rayon laser excite les marqueurs fluorescents qui a comme conséquence de produire un signal lumineux. Celui-ci sera dirigé vers un capteur CCD (Charge-Coupled Device) qui enregistrera ce signal.

La technologie PacBio utilise des « flowcell » nanofluidiques contenant des puits de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur au fond desquels est attachée une molécule d'ADN polymérase servant à gérer une synthèse contrôlée de brin d'ADN. Dans cette méthode, c'est l'ADN qui se déplace base par base le long de la polymérase (Goodwin et al., 2016) (Figure 48).

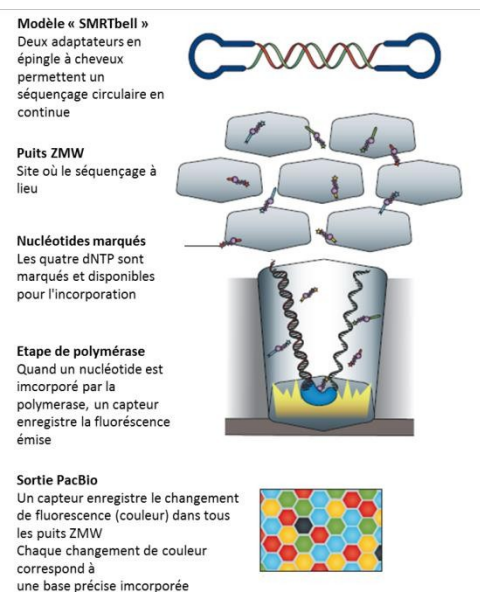


Figure 48: Principe du séquençage par la méthode « PacBio » (Goodwin et al., 2016).

➤ Ion Torrent

Le séquençage Ion Torrent de Life Technologies™ est un séquençage dit semi-conducteur. Cette méthode ne s'appuie pas sur la détection de la fluorescence de nucléotides. Elle utilise un capteur CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) qui détecte les ions H^+ qui sont relargués lors de la synthèse de l'ADN. Ce capteur est associé à des micro-puits. Il mesure le pH dans chacune des cavités, indicateur de la présence d'une ou de plusieurs bases intégrées dans l'ADN en cours de séquençage. Chaque cavité permet de séquencer un brin d'ADN d'environ 200 bases. Le processus est effectué par ajout des bases les unes après les autres pour identifier le nucléotide incorporé dans chaque cavité. Puis un rinçage par micro-fluidique est effectué avant le séquençage de la base suivante (Goodwin et al., 2016) (Figure 49).

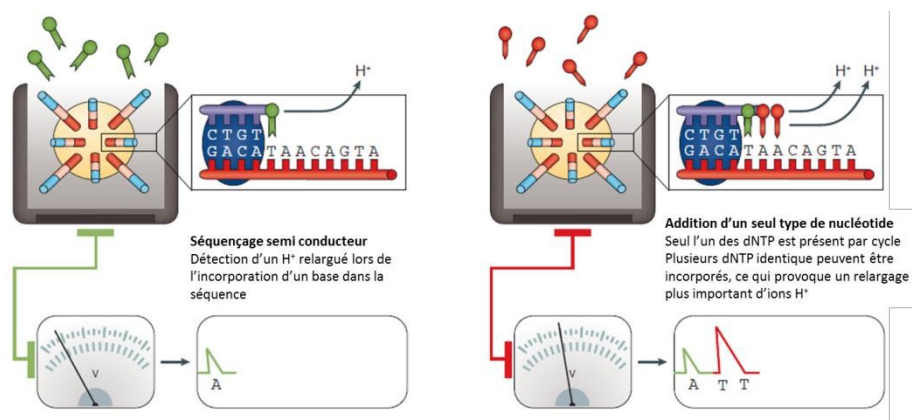


Figure 49: Principe du séquençage par la méthode de l'Ion Torrent (Goodwin et al., 2016).

➤ « Mate-pair »

La préparation de banques pour le séquençage Illumina en « Mate-pair » consiste à fragmenter l'ADN génomique mécaniquement (Covaris, Bioruptor) ou enzymatiquement (tagmentase, technologie Nextera) à des tailles inférieures à 0,8 kb. Des adaptateurs sont ensuite ajoutés pour permettre le séquençage à partir des deux extrémités du fragment. La préparation de banques en « mate pair » est conçue de façon à permettre le séquençage « en paire » de deux extrémités d'un fragment d'une taille d'origine de plusieurs kilobases. La Figure 50 montre la préparation d'une banque mate-pair pour le séquençage Illumina.

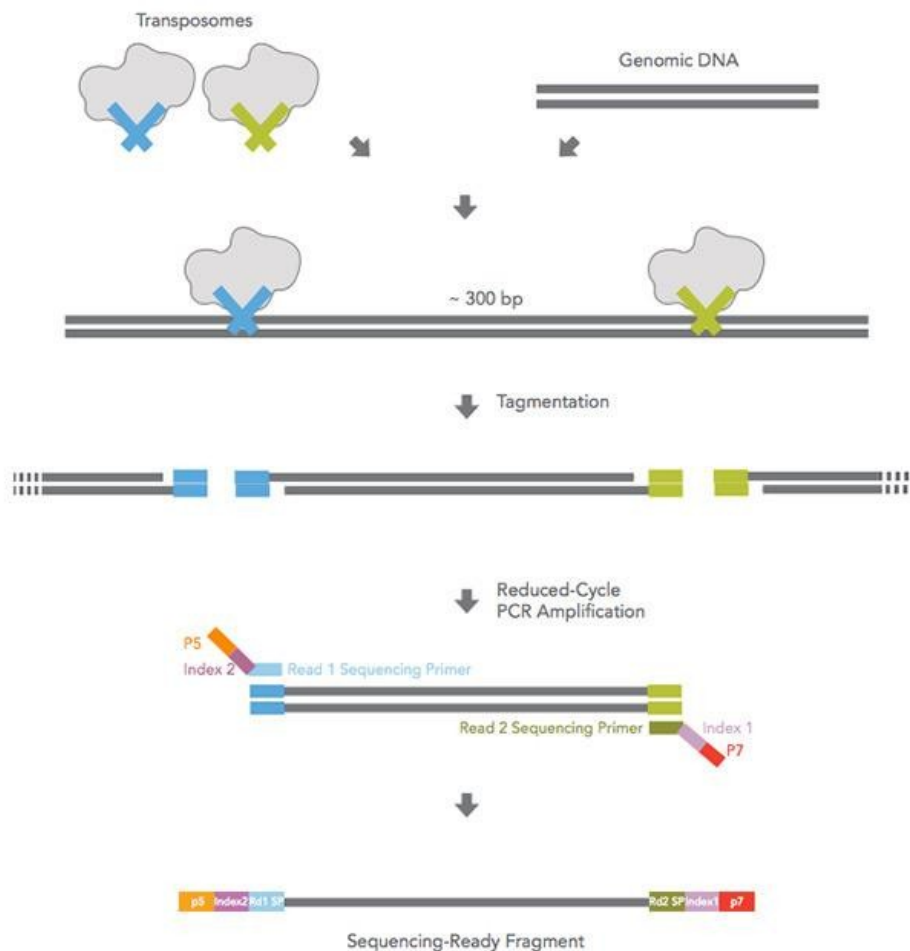


Figure 50: Représentation de la méthode « Mat-pair » pour le séquençage.

X.2. Assemblage et analyse des génomes.

L'assemblage des génomes séquencés a été réalisé par Erwan Corre de la plateforme ABiMS à la station Biologique de Roscoff (CNRS). Différents logiciels d'assemblage ont été utilisés SPAdes version 3.6.1 (Nurk et al., 2013) ; SSPACES version 3.0 (Boetzer et al., 2011) et SSPACES Long Read version 1.1 (Boetzer and Pirovano, 2014).

X.3. Hybridation ADN/ADN *in silico*.

L'hybridation ADN/ADN (DDH) fournit une évaluation de la similitude globale de l'ADN entre deux espèces ; par définition, si la DDH est supérieure ou égale à 70%, les deux ADN appartiennent à la même espèce (Colston et al., 2014).

L'hybridation ADN/ADN a été effectuée *in silico* grâce au web serveur GGDC signifiant *genome to genome distance calculator* (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) (Auch et al., 2010a , 2010b ; Meier-Kolthoff et al., 2013). Ce logiciel permet de déterminer les ressemblances et différences entre deux génomes. L'hybridation ADN/ADN a été effectuée en comparant la souche isolée durant cette étude à ces deux plus proches parents.

X.4. Détermination des valeurs d'identité nucléotidiques moyennes (ANI).

La valeur d'identité nucléotidique moyenne entre les gènes conservés de 2 souches ou *Average Nucleotides Identity* (ANI) est un indice qui se mesure entre deux génomes séquencés et qui permet d'évaluer la distance génétique entre eux (Konstantinidis and Tiedje, 2005).

Afin de calculer l'ANI, le web serveur EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>) ainsi que le web serveur JSpeciesWS (<http://imedea.uib-csic.es/jspecies/>) (Richter et al., 2016) ont été utilisés.

L'algorithme utilisé est celui proposé par Goris (Goris et al., 2007) et la valeur seuil de nouvelle espèce avec cet indice génomique est de 94-96% (Richter and Rossello-Mora, 2009).

Les analyses du génome ont été effectuées avec RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) ((Aziz et al., 2008; Brettin et al., 2015; Overbeek et al., 2014) ainsi qu'avec MaGe qui est une plateforme d'annotation et d'analyses des génomes microbiens (MicroScope) (Vallenet et al., 2013, Vallenet et al., 2009, Vallenet et al., 2006) (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/>).

Les génomes ont été annotés de façon semi-experte *via* la plateforme MaGe. Une étude de génomique comparative a été effectuée en utilisant les outils de comparaison génomique inclus dans la plateforme (Pan/ Core-genome et analyses de COG). Les voies métaboliques complètes ont été recherchées par l'outil MycroCyc.

Résultats et discussion

Résultats et discussion.

I. Diversité microbienne cultivable dans les bassins profonds hypersalés anoxiques de la Mer Méditerranée.

I.1. Approches culturelles traditionnelles.

Dans ce chapitre, les résultats par les approches culturelles « classiques », c'est à dire employant des milieux de culture spécifiques et dans des conditions communément employées en routine au laboratoire, sont présentés. Les cultures ont été suivies et maintenues pendant deux ans. Les cultures présentant un trouble dans la fiole sont observées au microscope à contraste de phase avec et sans lumière UV (Ultra Violet). A partir des enrichissements positifs, nous avons extraits l'ADN et réalisé un clonage. Pour chaque enrichissement positif 8 clones ont été séquencés. Les séquences sont comparées aux séquences nucléiques déposées dans la base de données internationale du NCBI en utilisant l'outil *BLAST* (Basic Local Alignment Search) pour rechercher les similitudes de séquences.

Cette approche culturelle a été réalisée à partir d'échantillons provenant de 5 bassins hypersalés (Tyro, Kryos, Urania, Thetis et Medee). Des enrichissements positifs ont été obtenus à partir d'échantillons récoltés de 4 sur 5 bassins. Nous n'avons obtenu aucune culture positive à partir des échantillons du bassin Medee (Tableau 5). 393 cultures d'enrichissements ont été inoculées. Au total 26 enrichissements positifs sur nos 8 milieux ont été obtenus, ce qui représente un taux de succès d'environ 7%. Deux enrichissements positifs sur le milieu autotrophe soufre/thiosulfate ; 3 sur le milieu avec acétate ; 6 sur le milieu additionné de TMA ; 2 sur le milieu contenant du lactate/acétate ; 3 sur le milieu benzoate/propionate ; 6 sur milieu hétérotrophe ; 1 sur dextran ; 2 sur choline ; 1 sur bêtaïne. Sur les 26 enrichissements positifs, 21 sont composés de microorganismes dont les gènes ARNr 16S montrent des taux de similitude élevés (> 98%) avec ceux de souches cultivées connues. Sur ces 21 séquences, 14 sont affiliées au genre *Halanaerobium* et plus précisément aux espèces *H. acetethylicum*, *H. saccharolyticum* et *H. sehlinense* ; 5 sont affiliées au genre *Methanohalophilus* et une est affiliée au genre *Halomonas* et à l'espèce *H. taeenensis*. Sur l'ensemble, cinq séquences présentent (voir tableau ci-dessus) des valeurs de similitudes inférieures à 94 % (la longueur des séquences analysées est d'environ 800 pb) avec les séquences les plus proches dans la banque de données internationale

et pourraient donc représenter de potentiels nouveaux genres microbiens des domaines *Archaea* et *Bacteria*.

Tableau 5: Synthèse des enrichissements positifs obtenus en fonction de la salinité et de la source de carbone ajoutée dans le milieu. Dans la première colonne est listé le code de chaque échantillon, le premier chiffre après le nom du bassin correspond au code attribué en fonction de la salinité d'origine de l'échantillon. (cf. matériel et méthode). Le deuxième chiffre indique à partir de quel milieu a été réalisé l'enrichissement. Dans la colonne 2 sont décrites les salinités des échantillons. La colonne 3 correspond aux milieux de culture utilisés et la nature des métabolismes recherchés avec un code milieu suivant : 1 – autotrophe nitrate ; 2- autotrophe soufre/thiosulfate ; 3- autotrophe fer ; 4- acétate ; 5- Triméthylamine (TMA), 6- lactate/acétate ; 7- benzoate/propionate ; 8- hétérotrophe, 9- choline ; 10- dextran ; 11- bétaine. Exemple : Tyro 2.4 : provient de l'échantillon initial à une salinité de 16% (Niskin #11 ; tableau matériel et méthode) et enrichie sur le milieu n°4(acétate). Dans les colonnes 4,5 et 6 sont décrits, respectivement, les temps d'incubation des cultures d'enrichissement, la morphologie des microorganismes enrichis et le pourcentage d'identité de la séquence de l'ADNr 16S avec la souche cultivée la plus proche.

Code Echantillon	Salinité (g.l-1)	Milieu	Temps d'incubation	Morphologie	Sequence Blast (1000 pb)
Tyro 1.4	200	Acetate	87 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium acetethylicum</i> 98%
Tyro 2.4	200	Acetate	87 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 97%
Tyro 1.8	200	Heterotroph	67 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium acetethylicum</i> 98%
Tyro 2.8	200	Heterotroph	67 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium acetethylicum</i> 98%
Tyro 1.5	200	TMA	8 mois	coques	<i>Methanohalophilus Halophilus</i> 98%
Tyro 2.5	200	TMA	8 mois	coques	<i>Methanohalophilus Halophilus</i> 98%
Tyro 18.2	120	Autotroph S°	14 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 98%
Tyro 18.4	120	Acetate	73 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 98%
Tyro 18.5	120	TMA	73 jours	coques	<i>Methanohalophilus halophilus</i> 98%
Tyro 18.6	120	Benzoate/ propionate	35 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium sehlinese</i> 98%
Tyro 18.8	120	Heterotroph	10 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 99%
Tyro 18.9	120	Choline	11 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 99%
Tyro 18.10	120	Dextran	11 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 99%
Tyro 18.11	120	Bétaine	11 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 99%
Thetis 21.5	120	TMA	87 jours	coques	<i>Methanohalophilus halophilus</i> 98%
Thetis 21.8	120	Heterotroph	29 jours	bâtonnet avec corps sphériques	<i>Mariniphaga anaerophila</i> 89%

Thetis 22.2	120	Autotroph S°	16 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 98%
Thetis 22.6	120	Benzoate/ propionate	35 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium sehlinense</i> 99%
Thetis 22.7	120	Acetate/ lactate	29 jours	bâtonnet	<i>Halanaerobium saccharolyticum</i> 98%
Thetis 22.8	120	heterotroph	29 jours	bâtonnet avec corps sphériques	<i>Mariniphaga anaerophila</i> 89%
Kryos 23.5	120	TMA	87 jours	coques	<i>Methanohalophilus halophilus</i> 98%
Urania 26.6	120	Benzoate/ propionate	17 mois	vibrio	<i>Desulfonatronovibrio hydrogenovorans</i> 91 %
Kryos 23.9	120	Choline	67 jours	filament fin	<i>Marinilabilia salmonicolor</i> 88%
Thetis 30.5	60	TMA	73 jours	coques	<i>Methanohalophilus halophilus</i> 99%
Thetis 30.7	60	Acetate/ lactate	87 jours	bâtonnet	<i>Fusibacter paucivorans</i> 89%
Thetis 30.8	60	Heterotrophe	14 jours	bâtonnet	<i>Halomonas taeanensis</i> 99%

La présence de représentants appartenant aux genres *Halanaerobium*, *Halomonas* et *Methanohalophilus* dans nos enrichissements est cohérente avec les caractéristiques physiologiques décrites pour ces genres et les conditions environnementales rencontrées dans les bassins profonds hypersalés.

Le genre *Halanaerobium* comprend des bactéries halophiles anaérobies dont le métabolisme est la fermentation. Ces microorganismes fermentent les sucres pour former de l'acétate, de l'éthanol, du CO₂ et de l'hydrogène. Leur croissance est optimale entre 100 et 145 g.L⁻¹ de NaCl et jusqu'à 300 g.L⁻¹ de NaCl. Les représentants cultivés de ce genre sont capables de réduire à la fois le soufre et le thiosulfate. La voie de dégradation de la bêtaïne a été mise en évidence par des analyses *in silico* dans 30% des génomes de souches ou espèces affiliées au genre *Halanaerobium* (Daly et al., 2016). La dégradation de la bêtaïne, soluté compatible très largement utilisé par les microorganismes, produit du TMA et de l'acétate. Le TMA est un substrat non compétitif pour les méthanogènes et notamment dans les environnements hypersalés pour les membres du genre *Methanohalophilus*.

Le genre *Methanohalophilus* comprend des microorganismes anaérobies halophiles modérés qui produisent du méthane à partir de composés méthylés. Ces microorganismes réputés pour être difficiles à cultiver ont été enrichi après un temps d'incubation assez long, en présence de 60 à 120 g.L⁻¹ de NaCl (temps d'incubation supérieurs à deux mois) et 200 g.L⁻¹ de NaCl (jusqu'à 8 mois d'incubation).

Le genre *Halomonas* est composé de microorganismes aérobies halophiles hétérotrophes (Vreeland, 2015). Certaines souches du genre sont capables d'une croissance en anaérobiose en fermentant des sucres ou en réduisant les nitrates. Elles se développent dans une large gamme de sels de 0,1 à 325 g.L⁻¹ de NaCl.

Dans le cas des cinq séquences obtenues affiliées à des potentiels nouveaux genres, nous ne pouvons pas proposer de liens avec leurs caractéristiques physiologiques. Les 2 séquences affiliées au genre *Mariniphaga* montrent des similitudes inférieures à 90 % et correspondent à des cellules en formes de bâtonnets présentant un renflement (figure 51). Malgré de nombreuses tentatives de maintien de cette culture singulière dans différentes conditions (salinité, température, sources de carbone, accepteurs d'électrons) aucune des conditions testées n'a montré de résultats. Il est fort probable que le renflement de la cellule observé soit un signe de stress physiologique.

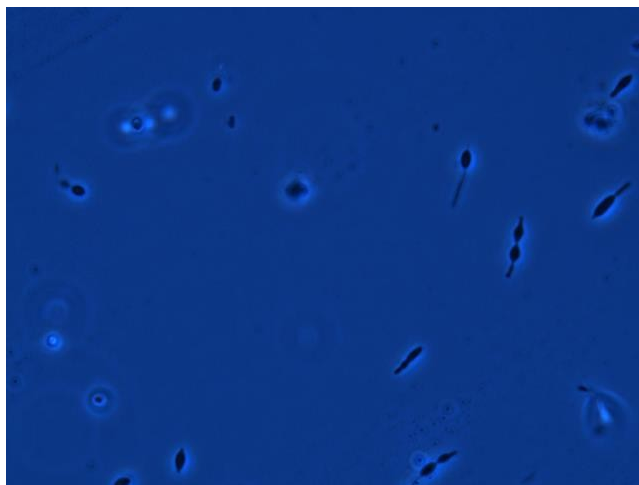


Figure 51: Photographie en microscopie à contraste de phase, objectif X100, de l'enrichissement 22.8. Les cellules présentent un renflement.

La séquence d'ADNr 16S de l'enrichissement positif Urania 26.6 montre une similitude de 91 % avec *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*. L'observation des cellules au microscope photonique de cet enrichissement révèle la présence de cellules en forme de vibrio, une morphologie similaire au genre *Desulfonatronovibrio* (figure 52). 17 mois d'incubation ont été nécessaires pour déclarer cet enrichissement positif. Les différentes tentatives de repiquages n'ont pas permis de maintenir et de stabiliser cette souche.

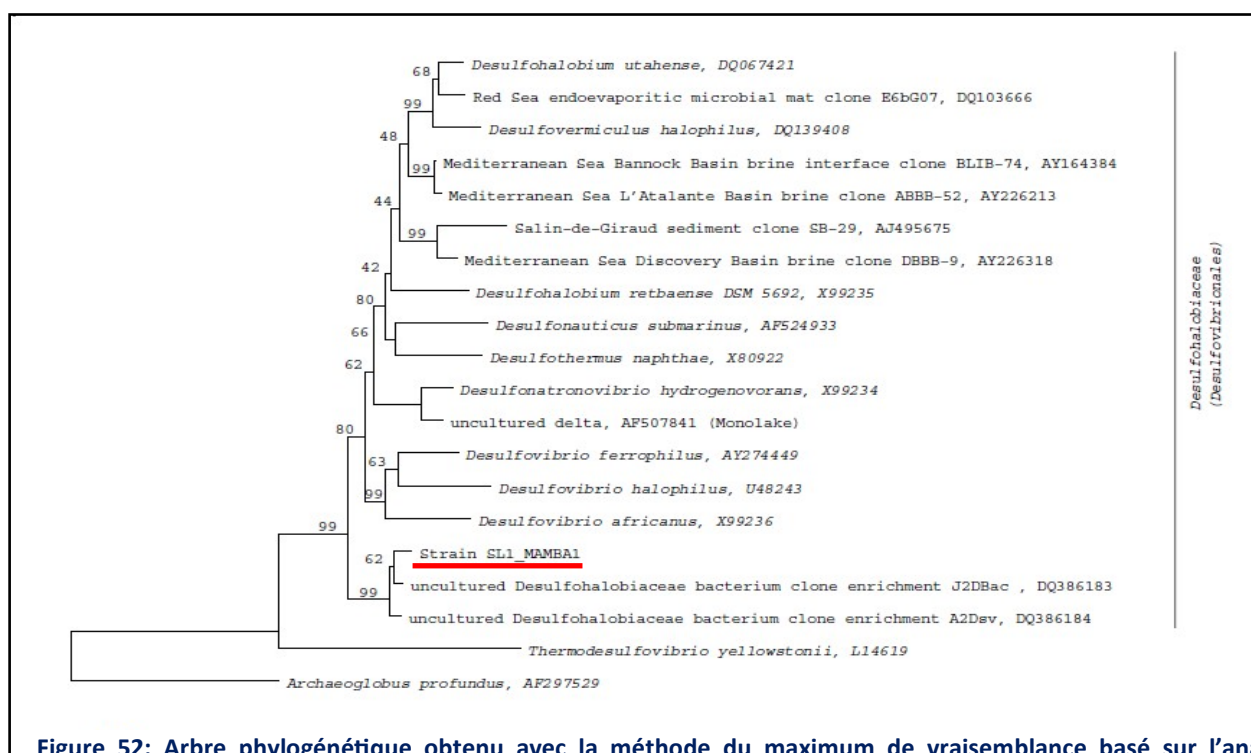


Figure 52: Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode du maximum de vraisemblance basé sur l'analyse du gène codant pour la petite sous-unité 16 du ribosome (ARNr 16S). La position de la séquence correspond à la souche « Strain SL1 MAMBA1 » est soulignée en rouge. L'échelle correspond à 5% de divergence dans la séquence nucléique.

L'enrichissement de cette souche a été déclaré positif après 17 mois d'incubation en raison de l'observation au microscopie photonique à contraste de phase de cellules en formes de vibrio dans l'enrichissement.

De la même façon, l'analyse génétique de l'ADN extrait de la culture d'enrichissement 30.7 montrant une similitude de 89% avec *Fusibacter paucivorans* a malheureusement été perdue.

A ce jour, seule la culture d'enrichissement, obtenue à partir des échantillons de saumure du bassin Kryos, correspondant à l'enrichissement 23.9 additionné de choline (tableau 5), était

stable dans le temps. L'analyse moléculaire de cet enrichissement révèle la présence de séquences d'ADNr 16S proches de 88 % de similitude avec l'espèce cultivée *Marinilabilia salmonicolor* souche NRBC 15948. Nous avons procédé à l'isolement de cette souche en utilisant la technique de série de dilution jusqu'à extinction. L'observation microscopique de cette souche révèle une morphologie cellulaire de longs filaments très fins.

Une fois la souche purifiée, nous avons procédé au séquençage complet de l'ADNr 16S. L'analyse phylogénétique a confirmé que le plus proche représentant cultivé est bien affilié au genre *Marinilabilia* avec des valeurs de similitude de 88%. Les séquences présentant les plus fortes valeurs de similitude correspondent à des séquences d'organismes incultivés avec 93 à 95% de similarité. L'ensemble de ces séquences d'organismes incultivés sont issues d'environnements hypersalés et des DHABs de Méditerranée. C'est le cas pour les séquences notées KRYOS_CHW_E38, UBBB-48, U37_21p1%, ULIB-58_out dans l'arbre obtenues des bassins Kryos pour la première et Urania pour les 2 autres (figure 53). La souche Kryos 23.9 représente un nouveau genre bactérien voire une nouvelle famille. Il est important de poursuivre la caractérisation physiologique et génomique de cet isolat. Les données obtenues pourraient apporter de précieuses informations (condition optimale de croissance, potentiel métabolique) pour essayer de mettre en œuvre des approches pertinentes pour isoler d'autres représentants de lignées incultivés inféodées aux DHABs.

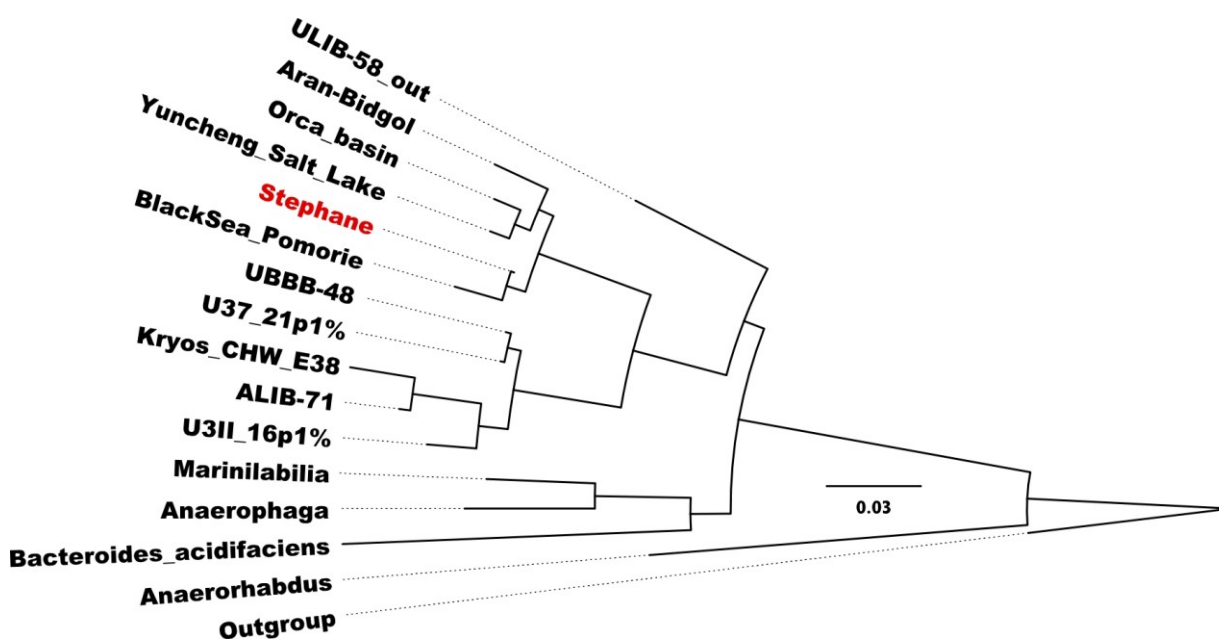


Figure 53: Arbre phylogénétique réalisé à partir de l'ADNr 16S de l'isolat SLHKRYOS 23.9 (ici noté Stéphane).

La souche SLHKRYOS 23.9 se développe à 120 g.L⁻¹ de NaCl à température ambiante sur un milieu composé d'extrait de levure et choline. Un large éventail de substrats et de conditions de culture ont été testé, cependant cette souche montre une densité cellulaire maximale de 5 X 10⁷ cellules/ml même après 2 mois d'incubation. Nous n'avons pas réussi à trouver les conditions requises qui permettraient d'atteindre une biomasse de 10⁸ cellules/ml. En fin de croissance, le milieu dont la concentration en carbone est faible, présente un très léger trouble microbien. Les faibles densités cellulaires et les difficultés à cultiver cette souche ne permettent pas d'envisager un dépôt de cette souche dans les collections internationales de microorganismes. Nous envisageons donc de séquencer le génome de cette souche. Le séquençage complet de son génome facilitera les hypothèses sur son potentiel génétique et l'identification d'une voie métabolique caractéristique ou l'évidence d'une auxotrophie, qui permettrait d'améliorer les densités cellulaires. Le dépôt dans les collections internationales de microorganismes est nécessaire dans l'optique de publier et de décrire ce nouveau taxon.

L'analyse moléculaire des cultures d'enrichissement montre que l'approche culturelle traditionnelle a permis de mettre en évidence des microorganismes fermentaires anaérobies appartenant au genre *Halanaerobium* ou anaérobies facultatifs du genre *Halomonas*, et des archées méthanogènes halophiles appartenant au genre *Methanohalophilus*. Il a été suggéré que la méthanogénèse dans les bassins hypersalés profonds anoxiques seraient dû aux membres de la lignée MSBL1 (Van der Wielen et al., 2005). Les résultats d'études antérieures obtenues par l'approche « Single Cell » à partir de cellules appartenant à la lignée MSBL1, semblent indiquer que ces cellules ne possèdent pas les enzymes connues à ce jour pour réaliser les différentes étapes de la méthanogénèse (Mwirichia et al., 2016). De plus aucun isolat de cette lignée n'étant disponible, les conclusions sur le métabolisme des représentants de cette lignée MSBL1 restent très spéculatives. Les approches moléculaires mettent rarement en évidence la présence des séquences appartenant au genre *Methanohalophilus* dans ces bassins probablement parce que les méthanogènes ne représentent qu'une faible proportion des *Archaea* présentes. Par exemple l'analyse des méthanogènes dans des cultures en série de dilution (NPP) indique que le nombre de méthanogènes dans des sédiments marins superficiels de l'Oregon associés à des hydrates de gaz n'est que de 10¹ à 10² cellules par ml (Kendall et al., 2006) et échappent ainsi aux outils de biologie moléculaires. Une étape préalable de mise en culture des méthanogènes est donc

indispensable. La mise en évidence par des approches culturelles de microorganismes affiliés au genre *Methanohalophilus* dans 3 bassins Tyro, Kryos et Thetis suggère que ces microorganismes semblent être impliqués dans la production du méthane *in situ* dans ces bassins et qu'ils sont viables et cultivables. C'est la première fois que des représentants de ce genre sont cultivés à partir d'échantillons originaires d'environnements marins profonds. L'ensemble des souches appartenant au genre *Methanohalophilus* sont isolées à partir d'environnements hypersalés terrestres (Katayama et al., 2014). En raison de l'importance du processus de méthanogenèse et de l'originalité des enrichissements obtenus, nous avons décidé d'isoler les souches affiliées au genre *Methanohalophilus* à partir des 3 bassins et de caractériser la physiologie et la génétique des nouveaux isolats. Ces travaux sont présentés dans le chapitre II.

Les approches culturelles traditionnelles par opposition aux approches dites haut-débits nous ont donc permis d'enrichir des microorganismes fermentaires, méthanogènes et sulfato-réducteurs. Aucune séquence n'était affiliée aux lignées MSBL pourtant diversifiées dans les environnements profonds hypersalés. L'ensemble des résultats de culture relatifs au bassin Thetis ont été valorisé et publié dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Michail Yakimov et l'article est présenté dans l'annexe 5 (La Cono et al., 2011).

I.2. Approches culturelles innovantes dites haut-débits.

Dans le cadre du programme Européen, MaCuMBA, un des objectifs était le développement de nouvelles approches innovantes de cultures afin de « cultiver l'incultivé ». Dans ce cadre, j'ai participé à la rédaction d'un chapitre portant sur les approches innovantes de culture. Ce chapitre publié dans le livre « The Marine Microbiome » édité par Springer est présenté en Annexe 1.

Une approche de culture haut-débit, développée dans le cadre de ce programme européen implique la réalisation de culture dans des plaques de 96 puits contenant 2,2 ml de milieu. Ainsi, l'effort employé à la multiplication des conditions de culture en plaques devrait permettre d'améliorer notre capacité à enrichir la fraction « incultivée » de la diversité microbienne.

La première étape de ce développement consistait à déterminer le nombre de cellules cultivables dans le milieu de culture défini pour rechercher des microorganismes aérobies,

hétérotrophes et pour trois salinités différentes (33, 100 et 200 g.L⁻¹ de NaCl) (Tableau 6), conditions représentatives des celles rencontrées *in situ* dans les bassins hypersalés.

Tableau 6: Dénombrement des populations microbiennes cultivables dans un milieu de culture destiné à enrichir des microorganismes hétérotrophes aérobies pour trois conditions de salinités à partir d'échantillons de saumures collectés en Mer Méditerranée (Medee, Tyro, Thetis et Urania) par la technique du nombre le plus probable (NPP). Entre parenthèse sont indiquées les concentrations en NaCl (en g.L⁻¹).

	Bassins hypersalés en Mer Méditerranée				
Concentrations en NaCl (en g.L ⁻¹)	Medee (235) Cellules/ml	Tyro 1 (80) Cellules/ml	Tyro 2 (310) Cellules/ml	Thetis (236) Cellules/ml	Urania (160) Cellules/ml
33	3,5 X 10 ²	5 X 10 ²	2 X 10 ²	2,5 X 10 ²	4 X 10 ²
100	4,5 X 10 ³	7 X 10 ³	3,5 X 10 ³	7 X 10 ³	4,5 X 10 ³
200	6 X 10 ²	8 X 10 ²	1 X 10 ³	2 X 10 ²	2 X 10 ²

Dans un second temps, une plaque par échantillon et par salinité a été inoculée avec 0,1 cellule cultivable. A partir du nombre de cellules cultivables dans l'échantillon à une condition donnée, l'échantillon de départ est dilué pour apporter dans l'inoculum 0,1 cellule cultivable par puits de la plaque. Le choix de 0,1 cellule cultivable par puits a pour but d'obtenir dans les puits de la microplaque des cultures clonales et de permettre aux microorganismes à croissance lente de se développer. Au total, 18 plaques de 96 puits ont été inoculées incluant des contrôles (milieu non inoculé) en cas de contamination et/ou contaminations croisées. Après 2 mois d'incubation, une croissance microbienne a été détectée dans 152 puits (Tableau 7).

Tableau 7: Nombre de puits montrant une croissance cellulaire dans le milieu de culture destiné à enrichir des microorganismes hétérotrophes aérobies dans trois conditions de

salinité. Entre parenthèse sont indiquées les concentrations en NaCl (g.L⁻¹). Au total 88 puits sont inoculés. Une colonne (8 puits) est un témoin de non contamination de la plaque 96 puits.

	Bassins profonds anoxiques hypersalés en Mer Méditerranée				
Concentrations en NaCl (en g.L ⁻¹)	Medee (235)	Tyro 1 (80)	Tyro 2 (310)	Thetis (236)	Urania (160)
33	11	4	16	6	12
100	8	12	9	13	16
200	13	8	4	11	9
Total	32	24	29	30	37

Au total, 152 puits ont été déclaré « culture positive » sur l'ensemble des plaques analysées. L'extraction d'ADN génomique total à partir des cultures positives a été réalisée et un total de 127 amplifications positives du gène de l'ADNr 16S par PCR ont été obtenues. Les produits d'amplifications PCR ont été séquencés directement, sans étape de clonage, à l'aide de l'amorce universelle U1492R. Au total, 106 séquences partielles d'ADNr 16S (environ 800 nucléotides) étaient exploitables, et 21 présentaient un double signal sur le chromatogramme (présence possible de plusieurs souches dans un même puits). Les résultats et l'affiliation au niveau du genre sont indiqués dans le tableau 8.

Tableau 8: Affiliation taxonomique des séquences d'ADNr 16S obtenues à partir des puits de cultures positives obtenues en plaques 96 puits par l'approche haut-débit à l'aide de l'outil BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Le niveau taxonomique retenu pour les résultats de BLAST est celui du genre. Le milieu de culture utilisé est spécifique des bactéries hétérotrophes aérobies et pour trois conditions de salinité (NaCl en g.L⁻¹) réalisées en parallèle. Les chiffres correspondent au nombre de séquences obtenues classées dans les groupes taxonomiques correspondant.

	Concentrations en NaCl		
<i>Affiliation taxonomique au niveau du genre</i>	33 g.L ⁻¹	100 g.L ⁻¹	200 g.L ⁻¹
<i>Chromohalobacter sp.</i>	5	6	9
<i>Halomonas sp.</i>	11	5	11
<i>Alcanivorax sp.</i>	0	8	4
<i>Salinicola sp.</i>	0	3	3
<i>Idiomarina sp.</i>	5	0	0
<i>Marinobacter sp.</i>	9	2	0
<i>Alteromonas sp.</i>	6	0	0
Total	35	44	27

Cette approche de culture haut-débit confirme la présence de microorganismes halophiles aérobies dans les différentes zones de l'halocline des bassins étudiés. L'ensemble des résultats en fonction des bassins sont présentés dans l'annexe 6. Les communautés microbiennes cultivables sont majoritairement affiliées au phylum des Proteobacteria des classes *Gamma* et *Beta*. Dans la classe *Gamma* des représentants cultivés appartenant à la fois à l'ordre des *Oceanospirillales* incluant les genres *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Alcanivorax* et *Salinicola* et à l'ordre des *Alteromonadales* avec le genre *Idiomarina* et *Marinobacter* ont été identifiés. Chez les *Betaproteobacteria*, des représentants cultivés appartenant au genre *Alteromonas* dans l'ordre des *Neisseriales* ont été obtenus.

Chez les Gamma-protéobactéries les genres *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Alcanivorax* et *Salinicola* sont composés de souches microbiennes aérobies et halophiles. Les représentants de ces genres se développent de manière optimale entre 10 et 15% de NaCl et ont une gamme de

croissance très large en présence de sels (*i.e.* de 0,5 à 30%) (Garrity et al., 2015). Les membres du genre *Chromohalobacter* ont une croissance optimale entre 8 et 10% de NaCl, et sont chimio-organotrophes; ils réduisent le nitrate en condition anaérobie. Le genre *Halomonas* est un genre très versatile puisque les représentants cultivés croient dans une gamme large de température, pH et sont retrouvés dans de nombreux biotopes ainsi que dans la biosphère souterraine (Gaboyer et al., 2014). Dans le genre *Halomonas*, certaines souches sont capables de croître en condition anaérobie *via* la fermentation ou la réduction des nitrates (Lee et al., 2016). Le genre *Alcanivorax* est retrouvé dans des milieux salés et pollués par des hydrocarbures (Denaro et al., 2014). Les membres de ce genre sont capables de dégrader les hydrocarbures linéaires ou aromatiques. Le genre *Salinicola* a été décrit suite à des expériences de dégradation de naphthalène par un consortium microbien (Anan'ina et al., 2007).

Les genres *Idiomarina* et *Marinobacter* sont des genres microbiens que l'on retrouve classiquement en milieu marin et dans les environnements hypersalés (Bowman and McMeekin, 2015). Plus précisément, les membres du genre *Idiomarina* sont capables de croître dans une large gamme de salinité (jusqu'à 25 % de NaCl). Par exemple, les espèces représentatives *Idiomarina halophila* et *I. salinarum* ont été isolées de marais salants (Lee et al., 2015). Certaines souches croient en anaérobiose en réduisant les nitrates. Les approches moléculaires basées sur l'analyse du gène codant pour l'ADNr 16S démontre la présence de représentant du genre *Idiomarina* dans des milieux salés et pollués par des hydrocarbures. Le genre *Marinobacter* a été décrit la première fois lors de la caractérisation de la souche *M. hydrocarbonoclasticus*, souche type capable de dégrader des hydrocarbures à chaînes linéaires ou aromatiques (Mounier et al., 2014). D'autres membres du genre *Marinobacter* sont également capables de dégrader les hydrocarbures (Al-Wahaib et al., 2016). Certaines espèces de ce genre sont halophiles telles que *M. salarius* et *M. halophilus* qui croient dans des gammes de salinité allant jusqu'à 20% de NaCl. Une des particularités des membres de ce genre est leur capacité à utiliser la bêtaïne comme soluté compatible pour lutter contre la forte pression osmotique de leur environnement. L'analyse du métagénome enrichi en représentants du genre *Marinobacter* ont mis en évidence une voie de synthèse de la bêtaïne à partir de la choline (Daly et al., 2016), suggérant que ces microorganismes peuvent subvenir à leur besoin en bêtaïne pour assurer leur adaptation vis à vis des fortes salinités.

L'ensemble de ces caractéristiques physiologiques vis à vis du sel démontre que la communauté aérobie cultivable dans les bassins profonds hypersalés de la Mer Méditerranée comprend des microorganismes capables de croître dans une large gamme de sels et donc dans une grande partie de la halocline. En condition anaérobie, ces microorganismes se développent *via* la fermentation ou la réduction des nitrates. Des concentrations de nitrate de l'ordre du micromolaire ont été mesurées dans les bassins (Daffonchio et al., 2006). Les membres des genres décrits plus haut sont pour certains capables de dégrader les hydrocarbures dont la présence dans ces bassins est avérée (Polymenakou et al., 2007). Cette seconde approche de culture haut-débit innovante n'a pas aboutie à l'enrichissement de représentants des lignées MSBL composés uniquement de séquences environnementales dont le rôle et la fonction dans l'environnement restent hypothétiques.

II. Isolement et caractérisation physiologique de 3 souches méthanogènes à partir des bassins profonds anoxiques hypersalés de la Mer Méditerranée.

Un des faits marquant de ce travail est notre succès pour enrichir des méthanogènes méthylotrophes halophiles modérés appartenant au genre *Methanohalophilus* à partir de plusieurs bassins profonds hypersalés de la Mer Méditerranée. En effet, jusqu'à ce jour, aucune souche appartenant à ce genre n'avait été isolée d'environnements profonds. Notre objectif était d'isoler et de caractériser 3 souches provenant de 3 bassins différents (Tyro, Kryos et Thetis) afin de déterminer la physiologie et les caractéristiques génomiques de ces méthanogènes.

II.1. Isolement des souches appartenant au genre *Methanohalophilus* à partir des bassins profonds hypersalés de Mer Méditerranée.

Les enrichissements sélectionnés les plus prometteurs pour réaliser les isollements en culture pure sont : Tyro 18.5, Kryos 23.5 et Thetis 21.5 (Tableau 5). Dans un premier temps la stabilité des enrichissements a été vérifiée par repiquages (10% d'incoculum) successifs dans un milieu contenant du TMA comme substrat catabolique pour la production de méthane (Cf. mat et

met). L'isolement des souches a été réalisé en gélose dans les flacons de Wolfe incubés à température ambiante (environ 20°C) et inoculés avec des cultures en phase exponentielle (environ 1×10^8 cellules/mL). Après 2 mois d'incubation, des colonies jaune moutarde d'environ 1 à 2 mm sont visibles et sont repiquées dans un milieu liquide de même composition (Figure 54). Pour l'étape de purification des souches respectives, trois passages sur milieu solide ont été réalisées. Après 1 an d'effort de purification des souches, 3 isolats méthanogènes, appelés SLHTYRO, SLHKRYOS et SLHTHETIS et provenant respectivement des bassins Tyro, Kryos et Thetis ont été obtenus en culture pure.



Figure 54: Observation des colonies obtenues en cultivant la souche méthanogène SLHKRYOS dans les flacons de Wolfe après deux mois d'incubation (flèches rouges).

II.2. Observation morphologique des trois souches méthanogènes isolées en culture pure.

L'observation au microscope à contraste de phase indique que les cellules sont des coques régulières. Sous lumière UV, les cellules fluorescent, ce qui nous indique la présence du facteur F420. Le diamètre des souches varient entre 0,7 et 1,2 μm (figure 55). Elles apparaissent isolées, en paire ou en amas cellulaires. La souche SLHTYRO présente une mobilité cellulaire, confirmée par l'observation d'un flagelle en MET (figure 56). Les 3 nouvelles souches se distinguent des 3

espèces connues du genre *Methanohalophilus* par la forme régulière de leurs cellules et la mobilité de SLHTYRO.

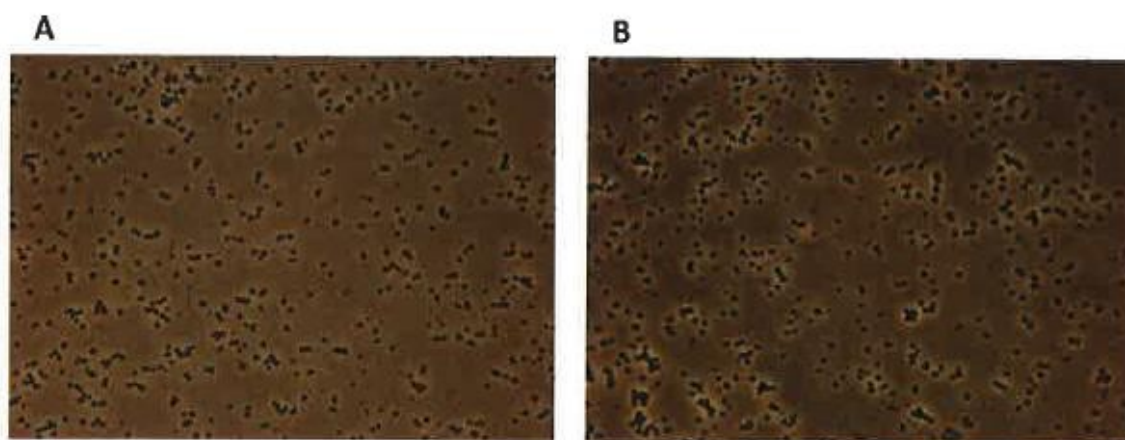


Figure 55: Photographie en microscopie à contraste de phase de la souche SLHTYRO (A) et SLHKRYOS (B). Les cellules ont été observées au grossissement X100.

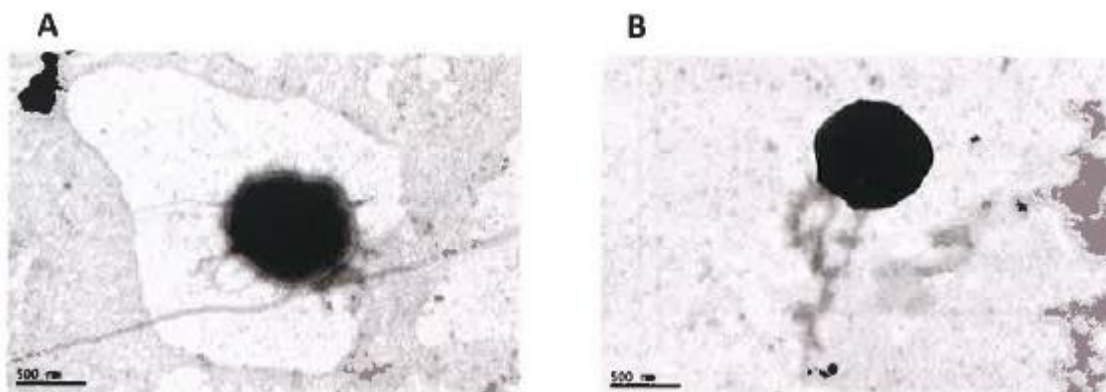


Figure 56: Photographie en microscopie électronique à transmission (MET) de la souche SLHTYRO (A) et SLHKRYOS (B). La barre en bas à droite correspond à l'échelle de 500 nm.

II.3. Caractéristiques physiologiques des souches méthanogènes du genre *Methanohalophilus*.

➤ Gamme de température

Les souches SLHTYRO et SLHKRYOS se développent de façon optimale à 30°C et SLHTHETIS à 25°C. Pour les 3 souches une croissance à 12°C et à 37°C a été observées, nous n'avons pas mesuré et détecté de croissance à 7°C et 40°C après 4 mois d'incubation (figure 57).

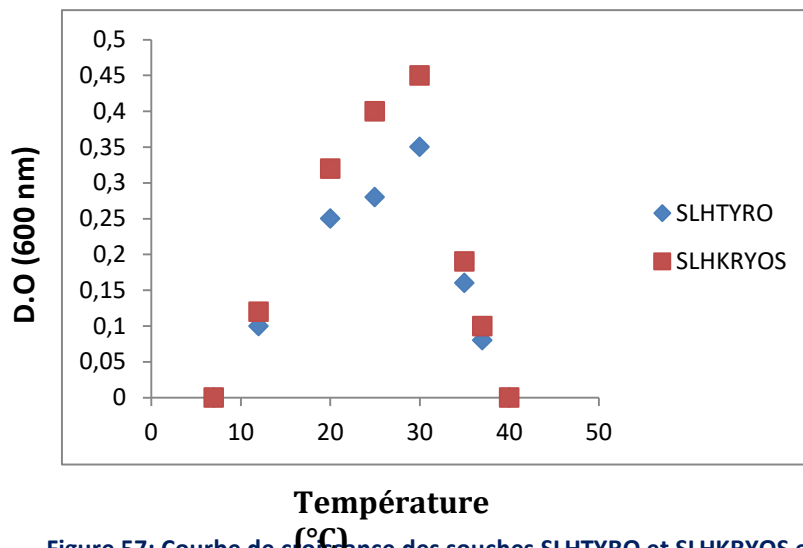


Figure 57: Courbe de croissance des souches SLHTYRO et SLHKRYOS en fonction de la température. DO : densité optique mesurée à 600 nm.

➤ Gamme de salinité

Chacune des souches a été incubée dans un milieu défini en présence de concentrations finales en NaCl comprises entre 0 et 300 g.L⁻¹. La souche SLHTYRO montre un optimum de croissance à 135 g.L⁻¹ de NaCl, et sa gamme de croissance se situe entre 45 et 240 g.L⁻¹ de NaCl. Aucune croissance n'a été détectée à 30 et 255 g.L⁻¹ de NaCl. La souche SLHKRYOS a un optimum de croissance à 105 g.L⁻¹ de NaCl, sa gamme de croissance se situe entre 45 et 210 g.L⁻¹ de NaCl. Aucune croissance n'a été détectée à 30 et 255 g.L⁻¹ de NaCl (figure 58). La souche SLHTHETIS a un optimum de salinité à 90 g.L⁻¹ de NaCl. Aucune croissance n'a été détectée à 30 et 255 g.L⁻¹ de NaCl. Sa gamme de croissance se situe entre 45 et 210 g.L⁻¹ de NaCl, aucune croissance n'a été détectée à 30 et 240 g.L⁻¹ de NaCl.

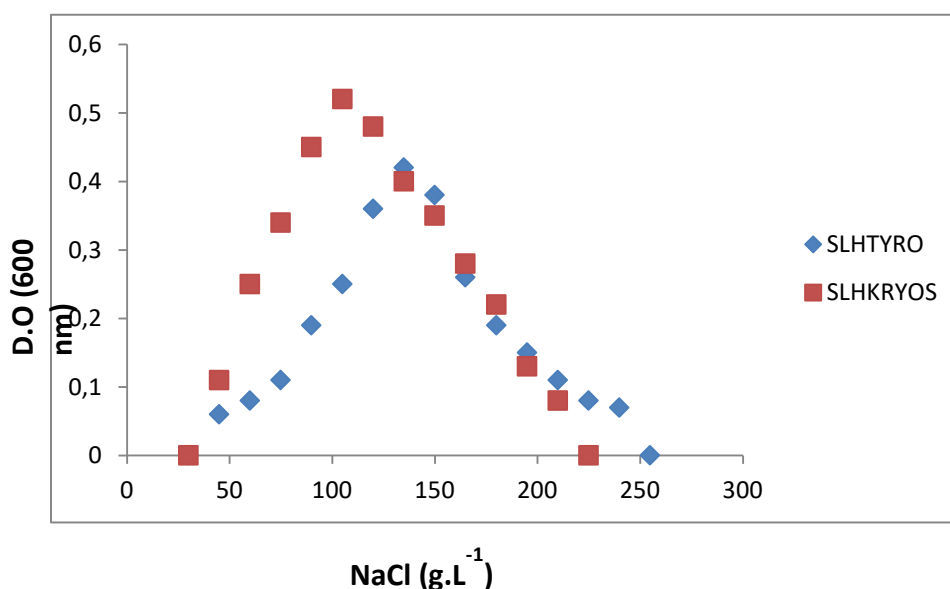


Figure 58: Gamme de croissance en fonction de la salinité (concentration en NaCl en g.L⁻¹) des souches SLHTYRO et SLHKRYOS. DO : Densité optique mesurée à 600 nm.

➤ Gamme de pH.

La gamme de pH pour les 3 souches est comprise entre 6,5 et 8,2. Aucune croissance pour les 3 souches n'a été observée à pH 6 et pH 8,5.

Une synthèse des conditions de croissance des souches SLHTYRO, SLHKRYOS, SLHTHETIS avec les souches types du genre *Methanohalophilus* est présentée dans le tableau 9.

Tableau 9: Comparaison des conditions physiologiques (température, salinité et pH) de croissance des souches du genre *Methanohalophilus* isolées dans cette étude à partir des bassins profonds hypersalés de Mer Méditerranée avec les représentants *Methanohalophilus* présentes dans les collections internationales.

	Température (°C)			NaCl (g.L ⁻¹)			pH		
	Min	Opt	max	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max
M. SLHTYRO	12	30	37	45	135	225	6.5	7.5	8
M. SLHKRYOS	12	30	37	45	105	195	6.5	7.5	8
M. SLHTHETIS	12	25	37	45	90	210	6.5	7.5	8
M. mahii	18	35	45	30	120	200	6.8	7.5	8.2
M. halophilus	18	26-36	42	40	70	150	6.3	6.5-7.4	7.5
M. portucalensis	30	42	45	70	120	180	6.4	7.4	8
M. levihalophilus	20	35	40	12	25	75	6.2	7-7.5	8.3

Les résultats présentés dans le tableau 9 indiquent que les souches isolées dans ce travail ont un minimum de température de croissance plus bas que les autres souches du genre *Methanohalophilus*. D'autre part, les souches méthanogènes isolées sont capables de se développer à la température mesurée *in situ* des DHABs (14°C). La gamme de salinité de nos souches s'échelonne entre 45 et environ 200 g.L⁻¹ de NaCl. Cette capacité de croissance dans une gamme de salinité importante doit permettre une flexibilité adaptative pour ces microorganismes à se développer dans l'épaisseur de l'halocline anoxique des DHABs dans laquelle le gradient de salinité est le plus fort.

➤ Croissance en présence de MgCl_2 .

Les souches SLHTYRO et SLHTHETIS ont été isolées des bassins profonds hypersalés Tyro et Thétis dits thalassiques, et la souche SLHKRYOS isolée du bassin Kryos dit athalassique. En effet le bassin Kryos athalassique est caractérisé par une concentration importante de Mg^{2+} (environ 4,38 M de MgCl_2) contrairement aux deux autres bassins thalassiques (entre 0,3 et 0,6 M de MgCl_2). Nous avons donc testé la croissance des 3 souches méthanogènes en fonction d'un gradient de concentration en chlorure de magnésium (MgCl_2) compris entre 0 et 3 M avec un pas de 0,5 M. La concentration en NaCl était constante et fixée à 90 g.L⁻¹.

Les souches SLHTYRO et SLHTHETIS se développent entre 0,5 M et 1 M de Mg^{2+} et ne montrent pas de croissance en l'absence de magnésium dans le milieu et à 1,5 M de Mg^{2+} . La souche SLHKRYOS se développe entre 0,5 et 1,5 M de Mg^{2+} , mais ne montre pas de croissance à 0 et à 2 M de magnésium. La souche SLHKRYOS semble donc avoir une gamme de tolérance vis-à-vis du magnésium plus large que les souches SLHTYRO et SLHTHETIS. Cette caractéristique est en adéquation avec son habitat naturel puisque le bassin Kryos est athalassique, c'est-à-dire riche en magnésium.

➤ Source de carbone et d'énergie pour la méthanogenèse des souches

Les 3 souches se développent en conditions optimales dans un milieu additionné de 20 mM d'amines méthylées : MMA, DMA, TMA comme source de carbone catabolique. Les observations démontrent que la croissance est plus rapide dans un milieu additionné de TMA plutôt que sur les autres composés méthylés testés (DMA, MMA, ...). Les 3 souches assimilent également le méthanol dans une gamme de concentrations comprise entre 10 et 50 mM. Aucune croissance n'a été observée en condition autotrophe (H_2/CO_2 , 2 bars) avec l'hydrogène ou le formate comme donneur d'électrons, ou encore dans un milieu additionné d'acétate ou de diméthylsulfide. D'autres substrats cataboliques alternatifs de la méthanogénèse ont également été testés (choline, bêtaïne et N,N diméthylethanolamine) (L'Haridon et al., 2014) avec à la fois les 3 nouvelles souches méthanogènes et les espèces connues du genre *Methanohalophilus*. Aucune croissance n'a été détectée sur ces 3 substrats pour l'ensemble des souches testées.

- Détection des composés méthylés, de leurs précurseurs et de la choline dans les échantillons bruts.

La bétaine, la choline sont des précurseurs des composés méthylés suite à une dégradation par des microorganismes. La dégradation de la bétaine par fermentation ou par la réaction de Stickland avec l'hydrogène ou la sérine a été démontrée chez les *Halanaerobiales* et conduit à la production de TMA et d'acétate (Moune et al., 1999). La dégradation de la choline par des bactéries sulfato-réductrices (genre *Desulfovibrio*) produit de l'acétate et du TMA (Hayward and Stadtman, 1959)(figure 59).

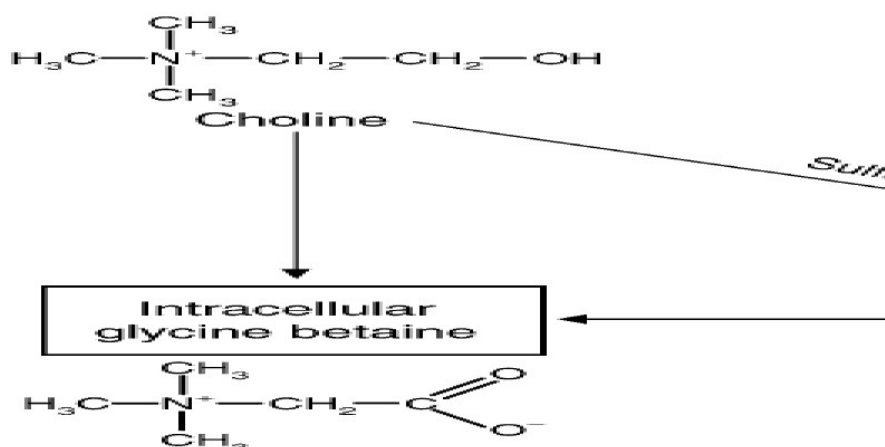


Figure 59: Schéma représentant les sources de triméthylamine et des composés méthylés.

Des échantillons d'eau provenant des bassins Tyro et Kryos ont été analysés par chromatographie ionique pour rechercher ces composés (Tableau 10).

Tableau 10: Concentrations des composés aminés et méthylés dans les eaux des bassins hypersalés profonds anoxiques Tyro et Kryos en micro- et millimolaires. MMA : Monométhylamine, DMA : Diméthylamine, TMA : Triméthylamine.

		Ammonium	MMA	DMA	TMA	Ethanol-amine	Monomethyl-ethanolamine	Dimethyl-ethanolamine	Choline
		μM	μM	μM	μM	μM	μM	μM	mM
Tyro	Upper interface	119,73	0	0	0,816	0	0	0	0
	Middle interface	349,408	0	0	0	0	0	0	0
Kryos	Brine	145,862	0	0	0,717	0	0	3,921	72
	Low Interface	347,096	0	0	0	0	0	13,509	79
	low interface	251,697	0	0	0,838	0,68	0	0,569	76
	Middle interface	176,569	0	0	0,474	0	0	8,419	71
	Middle Interface	126,254	0,509	0	0,315	0,769	0	5,523	68
	upper interface	110,38	0	0	1,227	0	0	11,501	22

Dans le bassin athalassique Kryos, il semble exister un gradient de concentration en choline entre la saumure et l'interface haute du bassin. En effet, les concentrations hautes en choline atteignent 70 mM dans la saumure et dans l'interface basse de l'halocline. La choline est un des constituants des membranes cellulaires. La concentration en choline diminue à l'interface haute du bassin avec 22 mM.

Dans le bassin Tyro, la présence de TMA a été détectée (0,816 μM) dans l'halocline et plus précisément dans un échantillon contenant 83 g.L⁻¹ de NaCl. Le MMA est uniquement présent dans l'interface médiane du bassin Kryos avec une concentration de 0,509 μM alors que le DMA n'est jamais détecté dans les échantillons analysés. D'autre part l'éthanolamine et le diméthyléthanolamine ont aussi été détectés. La détection de ces composés méthylés aminés est d'une importance considérable car leur présence renseigne à la fois sur les substrats potentiels disponibles pour le développement des communautés microbiennes spécifiques et sur les processus microbiens potentiels mis en œuvre. Par exemple, il est reconnu que la dégradation de la choline par des souches méthanogènes appartenant au genre *Methanococcoides* produit le

diméthyléthanolamine, le monométhyléthanolamine et l'éthanolamine (Watkins et al., 2012). Or le diméthyléthanolamine est un substrat reconnu pour la méthanogénèse méthylotrophe et en particulier les souches appartenant au genre *Methanococcoïdes* (L'Haridon et al., 2014). Ainsi, la diminution de la concentration en choline et la coexistence simultanée de diméthyléthanolamine et d'éthanolamine dans l'interface haute suggèrent l'existence d'un processus similaire de méthanogénèse méthylotrophe. D'autre part, la conversion de la choline en bétaine est communément retrouvée chez les bactéries halophiles en particuliers celles appartenant au genre *Marinobacter* (ex : *M. hydrocarbonoclasticus*). Dans notre étude certaines souches enrichies sont phylogénétiquement proches d'espèces appartenant au genre *Marinobacter*. Or les espèces caractérisées à ce jour sont capables de transporter la choline dans leur cytoplasme et de produire de la bétaine par deux réactions d'oxydation (Daly et al., 2016). L'oxydation de la choline par les espèces du genre *Marinobacter* peut être une source de Bétaine dans le bassin. Une fois libérée dans le milieu, la bétaine pourra être catabolisée en précurseurs méthylés nécessaires aux méthanogènes méthylotrophes.

Les concentrations en ammonium sont 100 à 300 fois plus élevées (entre 110 et 348 μM) dans les DHABs (Tableau 1) que celles mesurées en milieu marin (environ 1 μM) (Holmes et al., 1999). La diminution de la concentration en ammonium dans les parties hautes de l'halocline dans les bassins Tyro et Kryos suggère la consommation d'une partie de l'ammonium par les microorganismes. En effet, l'ammonium est une source d'azote utilisée par les microorganismes pour la synthèse de leur matériel cellulaire mais est aussi une source d'énergie pour les microorganismes réalisant l'oxydation de l'ammonium. Certaines *Archaea* appartenant au groupe des MG-I (Marine group I) au sein des *Thaumarchaeota* sont capables d'oxyder l'ammonium en nitrite (Kozlowski et al., 2016).

II.4. Effets de la pression hydrostatique sur la croissance des souches méthanogènes halophiles.

La croissance sous pression hydrostatique a été réalisée pour nos 3 isolats méthanogènes appartenant au genre *Methanohalophilus* et pour 3 espèces du genre *Methanohalophilus* (*M. mahii*, *M. portucalensis* et *M. halophilus*) disponibles dans les collections internationales.

Suite au congrès « Extremophile » à Saint-Petersburg (Russie) en 2014, une collaboration a été mise en place avec le laboratoire du Dr. Ulrich Stingl (Kaust, Arabie Saoudite) car il

s'intéresse à la diversité microbienne des bassins anoxiques hypersalés profonds de la Mer Rouge. Son équipe a isolé deux nouvelles souches, nommées RSE et RSK toutes deux affiliées au genre *Methanohalophilus*. J'ai donc suivi la croissance de ces 2 nouvelles souches vis-à-vis de la pression hydrostatique afin de comparer avec celles isolées de DHABs de la Mer Méditerranée dans cette étude.

Les souches SLHTYRO et SLHKRYOS ont été testées dans une gamme de pression entre 20 et 70 MPa (Figure 60). La croissance est optimale pour les 2 souches à 35 MPa, pression hydrostatique qui correspond à une pression de profondeur d'eau de 3500 m. Les bassins SLHTYRO et SLHKRYOS se situent à une profondeur de 3400 m et 3076 m respectivement. Aucune croissance n'a été observée à 70 MPa. Après une pré-incubation des souches à 70 MPa, et lorsque les fioles sont ensuite incubées à 30°C à la pression atmosphérique, une croissance est observée dans les fioles après une semaine d'incubation. Une pression de 70 MPa n'est donc pas létale pour ces 2 souches.

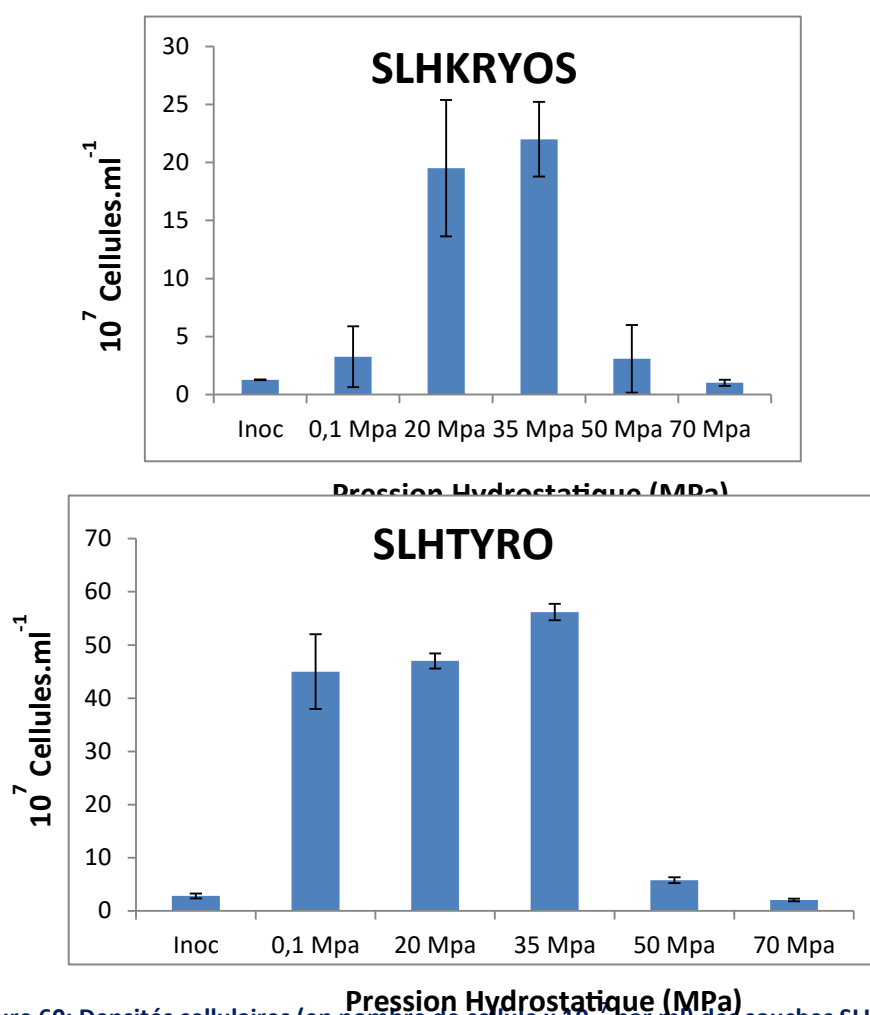


Figure 60: Densités cellulaires (en nombre de cellule x 10^{-7} par ml) des souches SLHTYRO et SLHKRYOS en fonction de la pression hydrostatique en MPa (MegaPascal= 10^6 Pascal). Le point 0,1 MPa correspond à une fiole préparée de la même façon que celles incubées sous pression hydrostatique et incubée dans une étuve sans pression hydrostatique. Inoc : Indique le nombre de cellules au début de l'expérience dans les flacons. Les barres verticales correspondent à l'écart type par rapport à une moyenne d'effectifs cellulaires obtenue à partir de triplicat de culture.

La croissance difficile de SLHTHETIS ne nous a pas permis d'obtenir des résultats exploitables. Une croissance a été observée de la même façon sous pression hydrostatique à 35 MPa mais les résultats ne permettent pas d'affirmer que la pression de 35 MPa correspond à la pression optimale de croissance de la souche SLHTHETIS.

La croissance sous pression des espèces types du genre a également été réalisée à 20, 35 et 50 MPa et est représentée dans la figure 61.

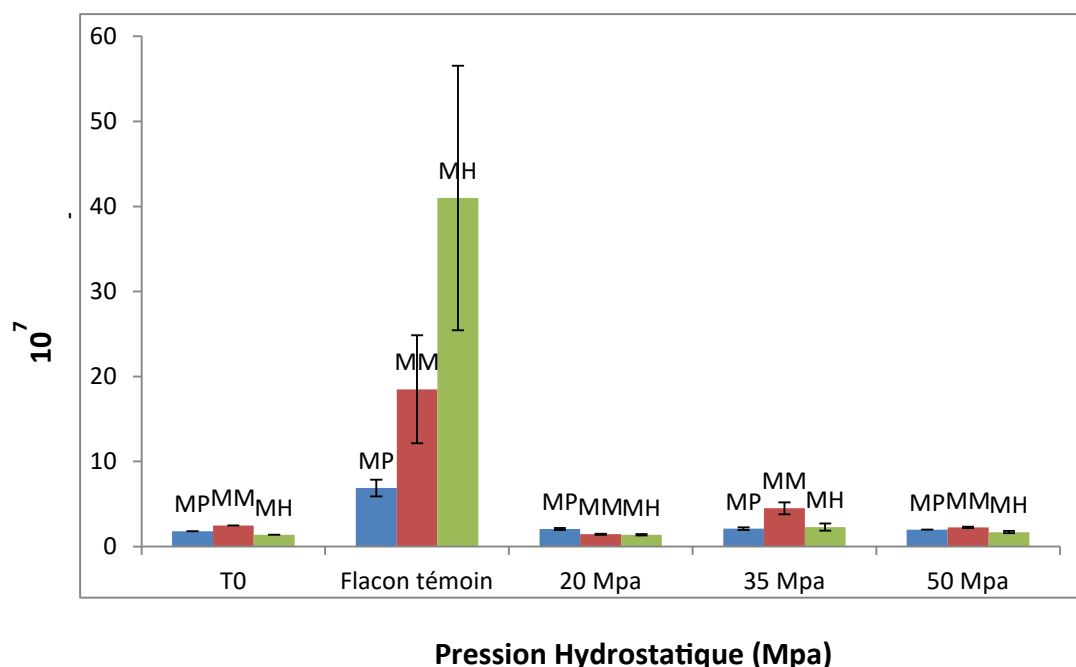


Figure 61: Densités cellulaires (en nombre de cellule x 10⁷ par ml) des souches des espèces *M. portucalensis* (MP), *M. mahii* (MM) et *M. halophilus* (MH) en fonction de la pression hydrostatique (en MPa= 10⁶ Pa). Le point 0,1 MPa correspond à une fiole préparée de la même façon que celles incubées sous pression hydrostatique et incubée dans une étuve sans pression hydrostatique. TO : Indique le nombre de cellules au début de l'expérience dans les flacons.

La croissance sous pression hydrostatique des isolats RSE et RSK a été testée entre 0,1 et 40 MPa. La souche RSE présente une croissance optimale entre 10 et 20 MPa, la souche RSK

présente une croissance sensiblement identique à 0,1, 10 et 20 MPa (figure 62). La profondeur des bassins en Mer Rouge est de 1549 m.

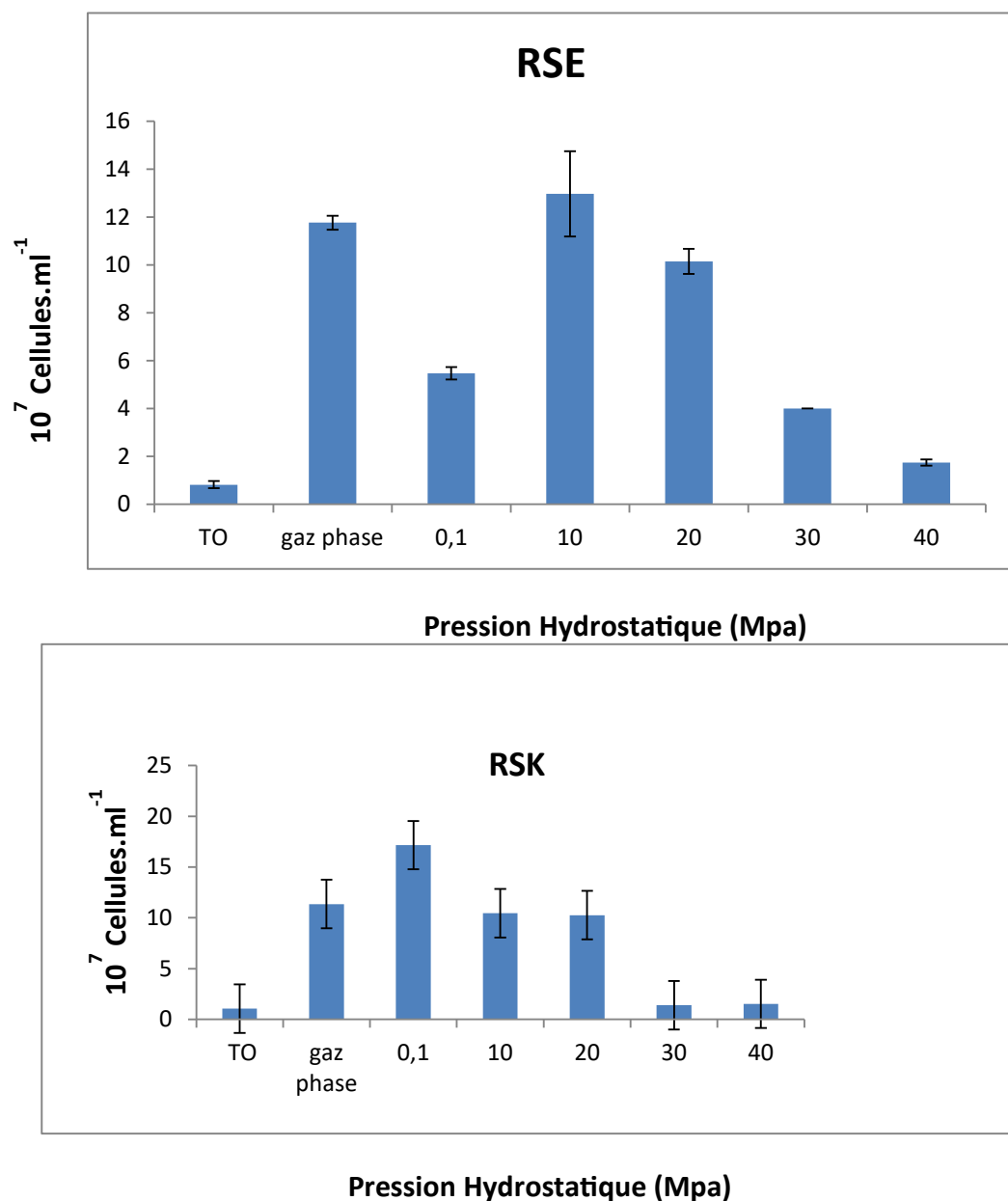


Figure 62: Densités cellulaires (en nombre de cellule x 10^7 par ml) des souches RSE et RSK en fonction de la pression hydrostatique en MPa ($\approx 10^6$ Pa). Le point 0,1 MPa correspond à une fiole préparée de la même façon que celles incubées sous pression hydrostatique et incubée dans une étuve sans pression hydrostatique. Le point gaz phase correspond à une fiole contenant une phase de gaz dans la fiole, condition classique de croissance d'un microorganisme en anaérobie. TO : Indique le nombre de cellules au début de l'expérience dans les flacons.

II.5. Analyse phylogénétique des souches méthanogènes halophiles à partir des gènes codant pour l'ARN 16S et le mcrA (méthyl coenzyme M réductase).

L'analyse phylogénétique de la séquence codant pour l'ARNr 16S du ribosome indique que les 3 nouveaux isolats obtenus dans cette étude sont apparentés avec des organismes cultivés appartenant au genre *Methanohalophilus* (Figure 63). Les séquences complètes de l'ADNr 16S de ces 3 nouveaux isolats présentent une homologie supérieure à 99,6% avec les représentants cultivés du genre *Methanohalophilus*, ce qui ne permet pas de les décrire comme nouvelles espèces par rapport aux recommandations de définition de l'espèce ($\geq 98,7\%$ de similarité de séquences de l'ADNr 16S) (Richter and Rossello-Mora, 2006). Les séquences de *M. SLHTYRO*, *M. SLHKRYOS* et *M. SLHTHETIS* montrent 99,8% de similarité entre elles pour les positions nucléiques analysées (tableau 11). Le séquençage des génomes des différentes souches (Chapitre V.3), nous permettra de calculer *in silico* la valeur d'hybridation ADN/ADN entre les différentes souches. Une valeur d'hybridation ADN/ADN inférieure à 70% permet la différenciation de deux souches en deux espèces distinctes (Stackebrandt, 2006).

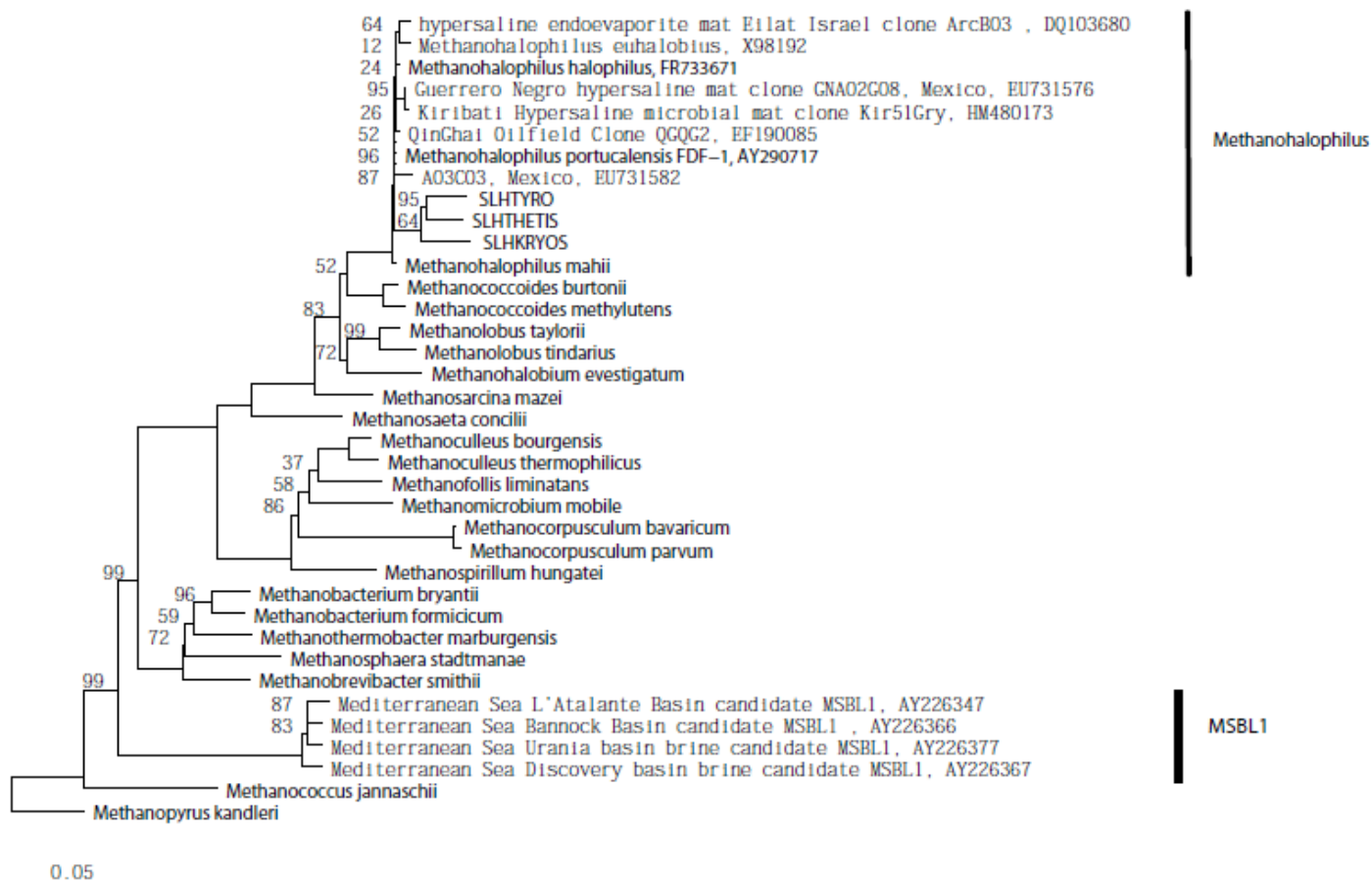


Figure 63: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse de l'ADNr 16S montrant la position phylogénétique des souches *M. SLHTYRO*, *M. SLHKRYOS* et *M. SLHTHETIS* calculé selon la méthode de distance (Neighbor joining). La séquence du gène codant l'ARNr 16S de *Methanopyrus kandleri* est utilisée comme groupe externe pour raciner l'arbre. Les valeurs en pourcentage au niveau des nœuds indiquent la robustesse des topologies d'arbre calculées à partir de 1000 ré-échantillonnages. La barre représente 5 substitutions pour 100 nucléotides.

Tableau 11: Matrice de similarité exprimée en pourcentage lorsque l'on compare des séquences de l'ARNr 16S des 5 souches appartenant au genre *Methanohalophilus*.

	<i>M. portucalensis</i>	<i>M. mahii</i>	<i>M. halophilus</i>	<i>M. SLHTYRO</i>	<i>M. SLHKRYOS</i>	<i>M. SLHTHETIS</i>
<i>M. portucalensis</i>	100					
<i>M. mahii</i>	99,7	100				
<i>M. halophilus</i>	99,8	99,8	100			
<i>M. SLHTYRO</i>	99,8	99,7	99,8	100		
<i>M. SLHKRYOS</i>	99,7	99,6	99,8	99,8	100	
<i>M. SLHTHETIS</i>	99,8	99,7	99,8	99,8	99,8	100

La figure 64 montre l'arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'acides aminés de la protéine *mcrA*.

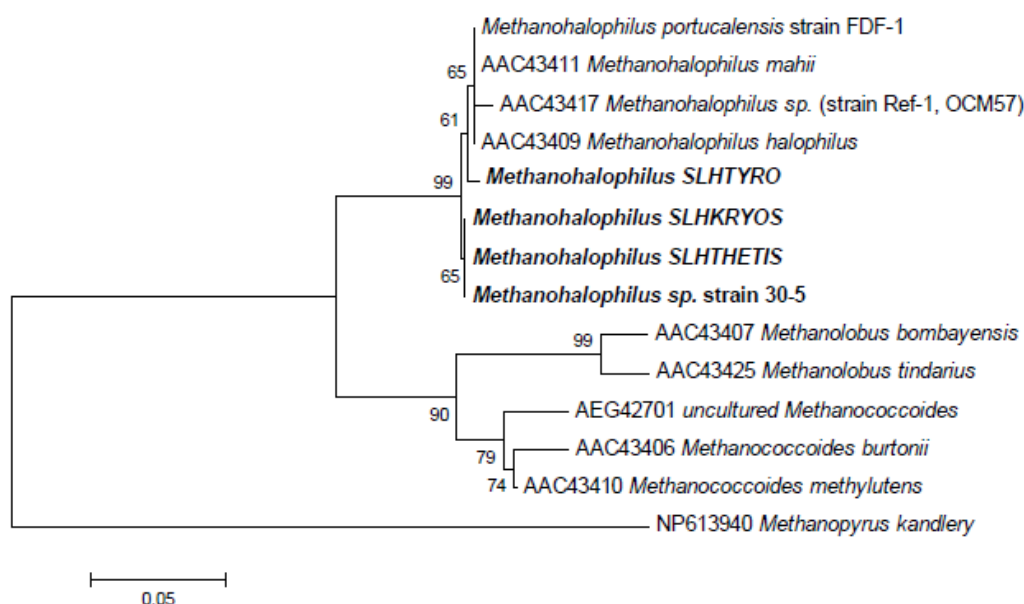


Figure 64: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences d'acides aminés de la protéine McrA montrant la position des souches M. SLHTYRO, M. SLHKRYOS et M. SLHTHETIS calculé selon la méthode du maximum de vraisemblance. La séquence de la protéine McrA de *Methanopyrus kandleri* est utilisée comme groupe externe pour raciner l'arbre. Les valeurs en pourcentage au niveau des nœuds indiquent la robustesse des topologies d'arbre calculées à partir de 1000 ré-échantillonnages. La barre représente 5% de divergence dans les séquences d'acides aminés.

- Synthèse sur la physiologie et la phylogénie des souches méthanogènes halophiles.

L'étude des conditions physiologiques de croissance des souches SLHTYRO, SLHKRYOS et SLHTHETIS a montré que la gamme des températures de croissance est cohérente avec une croissance possible à la température *in situ* (14°C) dans leur habitat naturel. De plus la croissance des souches en présence d'une large gamme de concentrations en NaCl suggère que les isolats sont capables de se développer dans pratiquement toute l'halocline.

Les souches ont été isolées à partir de bassins hypersalés situés à une profondeur d'eau de plus de 3000 m, profondeur qui correspond à une pression hydrostatique de 30 MPa. Or les expériences au laboratoire de croissance des souches SLHTYRO et SLHKRYOS sous pression hydrostatique ont révélé leur adaptation aux fortes pressions suggérant leur comportement piézophile. En effet ces deux souches se multiplient de façon optimale sous une pression hydrostatique de 35 MPa. La souche SLHTHETIS se développe à 35 MPa mais il n'a pas pu être déterminé si cette pression hydrostatique correspondait à une condition optimale de pression. Les incubations menées à 14°C et sous une pression hydrostatique de 35 MPa ont révélé la croissance des 3 souches après deux mois d'incubation, ce qui suggère que les souches sont adaptées aux conditions rencontrées dans leur habitat naturel *in situ*.

Les 3 souches méthanogènes sont méthylotrophes obligatoires. Les substrats cataboliques identifiés pour la méthanogénèse sont le MMA, le DMA, le TMA et le méthanol. Dans les milieux hypersalés, les composés méthylés peuvent être produits par la dégradation microbienne de la glycine bêtaïne. La glycine bêtaïne est un osmoprotecteur largement utilisé par les microorganismes contre le stress osmotique. L'utilisation et la synthèse *de novo* de la glycine bêtaïne comme osmoprotecteur a été démontré chez *Methanohalophilus portucalensis* (Lai et al., 2000). L'utilisation de la bêtaïne comme substrat pour la méthanogénèse n'a pu être démontré pour nos 3 souches et pour les membres du genre *Methanohalophilus*. Dans une étude récente, des auteurs proposent qu'un consortium microbien, constitué de deux bactéries affiliées au genre *Halanaerobium* et *Halanaerobacter* et d'une archée appartenant au genre *Methanohalophilus* isolée du bassin Thetis, est capable de réaliser la dégradation de la bêtaïne couplée à une production de méthane (Cono et al., 2015). Dans ce partenariat microbien, la dégradation de la bêtaïne est réalisée par la souche *Halanaerobacter* TB21 en présence d'hydrogène ou de sérine selon la réaction de Stickland (Moune et al., 1999). Le rôle de la souche TB24 appartenant au genre *Halanaerobium* est encore une énigme car il n'a pas été observé de dégradation de la

bétaïne par cette souche. Les membres du genre *Halanaerobium* sont des microorganismes fermentaires dont l'hydrogène est l'un des métabolites produits au cours de la fermentation. L'hydrogène pourrait être utilisé par la souche TB21 pour dégrader la bétaïne.

L'analyse phylogénétique des isolats montre que les souches appartiennent au genre *Methanohalophilus* avec des valeurs de similitude élevées (> 99,6%) avec les espèces *M. mahii*, *M. halophilus* et *M. portucalensis*. Dans l'hypothèse où nos isolats auraient été piégés dans les cristaux de sels lors de leur formation pendant la crise saline du Messinien, l'analyse phylogénétique aurait placé nos isolats à la racine de l'embranchement des *Methanohalophilus*. L'absence de distance entre les séquences nucléotidiques des ADNr 16S de nos isolats avec les souches types du genre *Methanohalophilus* ne permet d'étayer une hypothèse sur l'origine de nos isolats dans ces bassins. D'autres marqueurs génétiques et/ou le séquençage des génomes pourrait apporter des informations d'une part sur le potentiel génomique de nos souches mais aussi sur le caractère ancestral.

III. Etude la diversité microbienne dans le Bassin Tyro.

Une étude détaillée sur le bassin Tyro a été réalisée dans le cadre de cette thèse et est présentée dans ce chapitre. Afin d'établir un inventaire des communautés présentes sur le bassin Tyro, nous avons réalisé une approche moléculaire permettant d'établir la structure et la nature des communautés présentes. Notre démarche avait pour but de révéler la présence des lignées MSBL dans ce bassin pour lequel nous ne disposons pas d'informations sur la diversité microbienne présente. Une étude exhaustive sur ce bassin par des approches moléculaires avait été réalisée par une équipe de recherche Allemande dans le cadre d'un programme Européen mais les résultats par cette approche n'étaient pas disponibles. Les caractéristiques physico-chimiques des échantillons prélevées, les concentrations cellulaires, la structure des communautés et la diversité microbienne ont été étudiés sur ce bassin.

III.1. Dénombrements cellulaires.

Les dénombrements cellulaires mettent en évidence l'influence de l'augmentation de la salinité sur les abondances cellulaires (Figure 65). En effet, plus la salinité augmente plus les

effectifs cellulaires diminuent. Dans le bassin Tyro, les densités cellulaires mesurées varient de $1,65 \cdot 10^6$ cell/mL pour la salinité la plus faible (46,1‰) à $3,88 \cdot 10^4$ cell/mL pour la salinité la plus forte (303,6‰). Ces observations suivent le même schéma d'abondance décrit dans le bassin Bannock par l'équipe de Daffonchio, avec 10^6 cell/mL à l'interface jusqu'à 10^4 cell/mL dans la saumure (Daffonchio et al., 2006). Cependant, la distribution des effectifs microbiens totaux s'éloignent du profil observé dans le bassin de l'Atalante avec $3,57 \cdot 10^4$ cell/mL à l'interface jusqu'à $1,07 \cdot 10^5$ cell/mL dans la saumure (Yakimov et al., 2007). Pour les salinités les plus élevées (300 ‰ soit 300 g de sels par litre d'eau de mer), les abondances cellulaires sont comparables (environ $1 \cdot 10^4$ cell/mL).

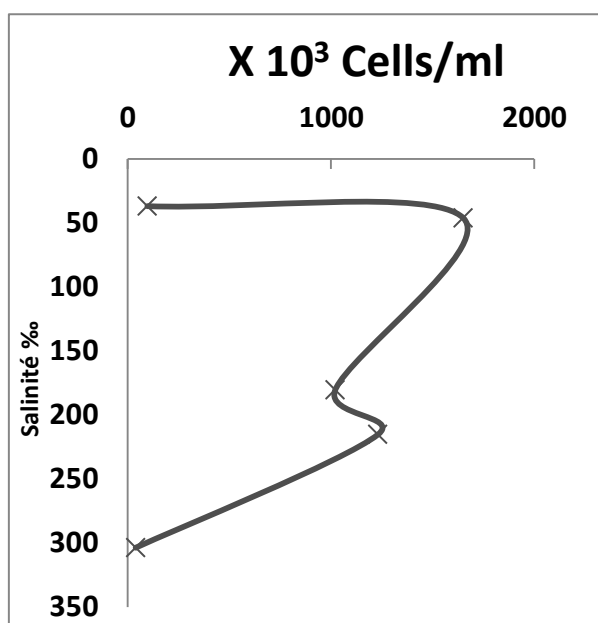


Figure 65: Représentation graphique de l'évolution de la concentration cellulaire en fonction de la salinité du bassin (‰).

III.2. Extraction des ARNs à partir des cartouches filtrantes.

- Amplification par RT-PCR à partir des matrices ARN extraites puis amplification par PCR nichée pour l'analyse DGGE.

Dans un premier temps, les conditions de RT-PCR ont dû être définies pour chaque échantillon. Une fois définie les conditions optimales (quantité de matrice ARN et température d'hybridation des amorces (55°C), les produits d'amplifications ont été utilisés comme matrices

dans une seconde amplification par PCR dite nichée à l'aide d'amorces internes pour analyse DGGE (Figure 66).

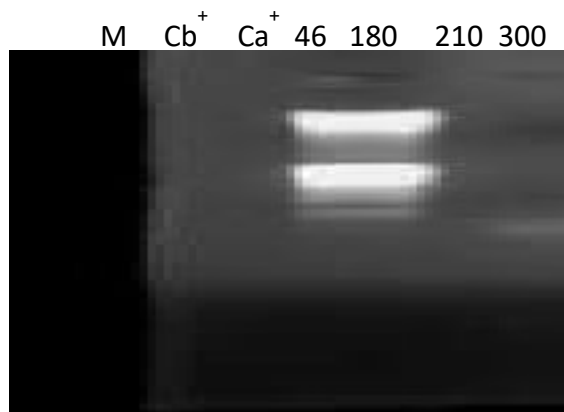
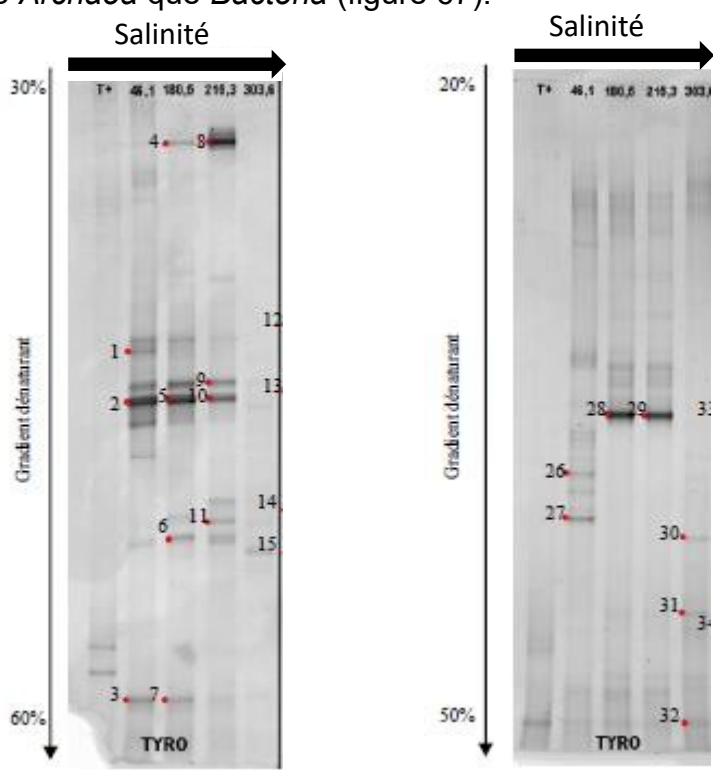


Figure 66: Gel électrophorétique de vérification de l'amplification par PCR dite « nichée » réalisée avec les couples d'amorces Saf1-GC/ SAf2-GC et 519R pour l'analyse des communautés Archaea en DGGE. M : marqueur de poids moléculaire (1 Kb, Promega). C+b : témoin positif bactérien; C⁺a : témoin positif archaéen; échantillon à 46 ; 180, 210 et 303 g.L⁻¹ de sels. Chaque dépôt des produits de PCR « nichée » est de 5 µL. Les bandes positives visibles sur le gel électrophorétique ont une taille attendue d'environ 200 pb.

III.3. Evolution des communautés microbiennes en fonction de la salinité analysée par DGGE.

L'observation des profils électrophorétiques de DGGE montrent un changement de la composition des communautés microbiennes en fonction de la salinité. Le nombre de bandes observées est plus important à la salinité la plus faible (46 g.L⁻¹ de sels). Les échantillons à 180 et 210 g.L⁻¹ de sels présentent la même structure puisque les mêmes bandes sont observées. L'échantillon de saumure à 300 g.L⁻¹ de sels révèle une diversité faible aussi bien dans la communauté *Archaea* que *Bacteria* (figure 67).



III.4 Diversité métabolique des communautés actives dans le bassin Tyro.
Figure 67: Profils électrophorétique de PCR-DGGE pour les *Archaea* (gradient 30% à 60%) et pour les *Bacteria* (gradient 20-50%) en fonction du gradient de salinité du bassin hypersalé profond anoxique Tyro. Chaque dépôt des produits de PCR-DGGE est de 15 µL sur un gel d'acrylamide à 8%.

Les ARNS retro-transcrits sont amplifiés par PCR, puis les produits d'amplification ont été clonés pour chaque échantillon. L'identité phylogénétique des communautés « actives » sont indiqués pour les représentants *Archaea* dans le tableau 12 et *Bacteria* dans le tableau 13.

- Diversité des *Archaea* incultivés métaboliquement actives dans le bassin Tyro.

Tableau 12: Identités des communautés *Archaea* métaboliquement « actives » dans le bassin Tyro. Le pourcentage d'identité des séquences analysées représente le niveau de similarité entre les séquences des gènes ADNr 16S (ADNr 16S codant) et celles présentent dans la banque de données internationales (NCBI). Le pourcentage de séquences identifiées est calculé par rapport au nombre total de clones séquencés.

Salinité (‰)	Groupe phylogénétique affilié (BLASTN 1000pb)	% d'identité	% de séquences identifiées	Références (Habitat d'origine)
46,1	<i>Uncultured Marine Group I Crenarchaeota</i>	99%	70%	DeLong E.F 2006, Gillan D.C. 2007 (High salinity, Antarctic bathypelagic sediments)
	<i>Uncultured marine group III Euryarchaeote</i>	94%	30%	DeLong E.F 2006 (High salinity)
180,5	<i>Uncultured Archaea</i>	97%	60%	Teske A. 2002 (hydrothermal sediment)
	<i>Uncultured Marine Group I Crenarchaeota</i>	99%	40%	Gillan D.C. 2007 (Antartic bathypelagic sediments)
215,3	<i>Uncultured candidate division MSBL1 Archaea</i>	98%	75%	Borin S. 2009 (Urania deep hypersaline basin)
	<i>Methanohalophilus sp.</i>	97%	25%	Robertson C.E. 2009 (hypersaline microbial mat)
	<i>Uncultured candidate division MSBL1 Archaea</i>	98%	60%	Van der Wielen P. W. 2005

303,6				(deep hypersaline anoxic basin)
	<i>Uncultured SB-1 group Euryarchaeota</i>	96%	40%	Eder W. 2002 (brine-seawater interface of the Shaban Deep)

Il est intéressant de noter que les inventaires d'ADNrc 16S ont révélé que les communautés microbiennes *Archaea* étaient peu diversifiées. Cinq phylotypes différents ont été répertoriés : MG-I, MSBL-I, MG-III, SB-1 et Euryarchaeota/Methanomicrobia/*Methanohalophilus*. Une proportion importante de clones analysés est affiliée à des MSBL-I avec 98 % d'identité confirmant leur dominance dans les saumures de Méditerranée comme cela a déjà été suggéré (Van der Wielen et al., 2005 ; Yakimov et al., 2007 ; Borin et al., 2009). Une fraction importante de la communauté *Archaea* est représentée par des phylotypes d'incultivés (MG-I, MSBL) classiquement rencontrés dans ces écosystèmes singuliers. Dans l'halocline les échantillons de salinités comprises entre 46,1 et 180,0‰, du bassin Tyro sont majoritairement dominés par des microorganismes du phylotype des Marine Group-I (MG-I) appartenant aux *Thaumarchaeota*, ainsi qu'à des *Archaea* sans représentants cultivées (Tableau 12) dont le rôle et la fonction ne peuvent pas être inférés. La présence de séquences appartenant aux MG-I a déjà été signalée dans des échantillons de saumures de DHABs de Méditerranée caractérisés par des salinités comparables (Van der Wielen et al., 2005 ; Yakimov et al., 2007 ; Borin et al., 2009). Les membres du MG-I sont impliqués dans l'oxydation aérobie de l'ammonium (Baker et al., 2012).

A partir d'une salinité de 200‰, les communautés *Archaea* sont majoritairement affiliées aux MSBL-I. Sans représentant cultivé, il n'est pas possible de proposer une hypothèse quant au métabolisme des représentants de la lignée MSBL1. Cependant les dernières études réalisés portant en particulier sur la technique de « Single-cell » démontrent que ces microorganismes ne seraient pas des microorganismes méthanogènes contrairement à ce qui avait été postulé auparavant (Mwirichia et al., 2016). Plus spécifiquement des communautés *Archaea* sont affiliées au genre *Methanohalophilus*, aux MSBL et d'autres séquences sont affiliées au groupe des SB-1 uniquement dans les échantillons caractérisés par la plus forte salinité (303,6‰) (Eder et al., 2002). Les méthanogènes appartenant au genre *Methanohalophilus* utilisent préférentiellement des composés méthylés comme substrat catabolique pour synthétiser du méthane (Robertson et al., 2009). Dans nos inventaires moléculaires les séquences affiliées à des phylotypes méthanogènes sont très rares en dépit des fortes concentrations en méthane relevées dans les échantillons de saumures de Méditerranée. Bien que les étapes d'amplification par PCR soient

extrêmement sensibles, certaines méthanogènes nécessitent une étape d'enrichissement dans des milieux de culture spécifiques pour pouvoir être détectées. La présence de représentants actifs du genre *Methanohalophilus* par les méthodes moléculaires confirme les résultats obtenus par les approches culturales et la caractérisation de l'isolat de *Methanohalophilus* M. SLHTYRO. Nos résultats démontrent que cet isolat pourrait être actif dans les conditions *in situ* du bassin. Les membres du groupe SB-1 ont été détectés dans des échantillons de saumure de bassins présents en Mer Rouge. Les représentants de ce groupe sont probablement impliqués dans la réduction des sulfates (Eder et al., 2002). Malheureusement, ces microorganismes n'ont pas été mis en évidence par les approches culturales.

- Diversité des *Bacteria* métaboliquement « actives » dans le bassin Tyro.

Tableau 13: Identités des communautés *Bacteria* métaboliquement « actives » dans le bassin Tyro. Le pourcentage de similarité représente le niveau de ressemblance entre les séquences des gènes ADNrc 16S de notre étude et celles présentes dans la banque de données internationales (GenBank). Le pourcentage de séquences identifiées est calculé par rapport au nombre total de clones séquencés.

Salinité (‰)	Groupe phylogénétique affilié (BLASTN 1000pb)	% d'identité	% de séquences identifiées	Références (Habitat d'origine)
46,1	<i>Uncultured gamma Proteobacteria</i>	98%	75%	Van der Wielen P. W. 2005 (deep hypersaline anoxic basin)
	<i>Uncultured delta Proteobacteria</i>	97%	25%	Van der Wielen P. W. 2005 (deep hypersaline anoxic basin)
	<i>Uncultured bacteria</i>	99%	15%	Daffonchio D. 2006 (deep-sea halocline)
180,5	<i>Uncultured candidate division MSBL2</i>	99%	40%	Daffonchio D. 2006 (deep-sea halocline)
	<i>Uncultured delta Proteobacteria</i>	99%	40%	Van der Wielen P. W. 2005 (deep hypersaline anoxic basin)
	<i>Uncultured SB1 group bacteria</i>	84%	20%	Eder W. 2002 (brine-seawater interface of the Shaban Deep)
215,3	<i>Uncultured candidate division MSBL2</i>	99%	100%	Daffonchio D. 2006 (deep-sea halocline)

303,6	<i>Uncultured bacteria</i>	99%	60%	Van der Wielen P. W. 2005 (deep hypersaline anoxic basin)
	<i>Halomonas sp.</i>	98%	40%	Okamoto T. <i>unpublished</i> (euryhaline halophilic microorganism)

Dans l'interface haute du bassin Tyro (46,1‰) les séquences d'ADNr 16S des communautés microbiennes sont affiliées aux groupes des *Gamma*, *Delta* des *Proteobacteria* et principalement à des phylum composés de séquences environnementales c'est-à-dire sans représentant cultivé (Tableau 13). La majorité des séquences des membres des *Delta*-protéobactéries sont affiliées au genre *Desulfobacterium* et *Desulfobacula* appartenant à la famille des *Desulfobacteraceae*. Ces phylotypes sont également observés dans le bassin de l'Atalante (Yakimov et al., 2007b) et Urania (van der Wielen et al., 2007). Les salinités supérieures à 180‰ semblent optimales pour le développement des communautés affiliées au groupe des MSBL2 (Daffonchio et al., 2006) et au groupe des SB-I (Yakimov et al., 2007) suggérant une adaptation des microorganismes aux hautes salinités.

Dans la saumure du bassin Tyro, seulement deux séquences sont affiliées au genre *Halomonas*. Ces deux séquences partielles d'ADNr 16S présentent une similarité de 95% avec l'espèce *Halomonas meridiana*. Ces résultats soutiennent les résultats obtenus par les approches culturelles (Cf chapitre I.2). En effet des souches appartenant au genre *Halomonas* ont été enrichis en ajoutant des concentrations de 200 g.L⁻¹ de NaCl dans les milieux de culture inoculés avec des échantillons du bassin Tyro.

L'analyse moléculaire des échantillons d'eau collectés au niveau du bassin profonds anoxique hypersalé Tyro confirme l'existence de lignées incultivées appartenant aux MSBL (notamment 1 et 2) fréquemment mises en évidence dans les DHABs. La lignée SB-1 est également inféodée aux environnements hypersalés. Des séquences de SB-1 ont été mise en évidence la première fois au niveau des DHABs de la Mer Rouge (Eder et al., 2002). La distribution de ces lignées dans le bassin Tyro démontre leur endémisme et est en adéquation avec les résultats précédemment publiés. Les lignées MSBL1 et SB-1 sont majoritairement retrouvées dans les parties basses, très salées (entre 120 et 340 g.L⁻¹ de sels) de l'halocline et dans la saumure suggérant une forte adaptation aux fortes pressions osmotiques. Dans ces

conditions extrêmes de salinité, la stratégie employée par les microorganismes pour survivre soulève de nombreuses interrogations.

La présence de séquences des genres *Methanohalophilus* et *Halomonas* à la fois dans les cultures d'enrichissements et les banques de clones suggèrent que ces microorganismes sont certainement adaptés et actifs dans les conditions de fortes salinités du bassin profond Tyro et jouent donc un rôle primordial dans le cycle du méthane et du carbone. Tous ces résultats suggèrent que les microorganismes sont capables de coloniser des environnements hypersalés profonds car ils sont certainement capables de développer des mécanismes d'adaptations vis à vis des fortes concentrations en sels. Comme cela a été proposé par d'autres équipes de recherche, l'étude des adaptations génétiques, notamment la stabilité des ARNr de microorganismes halophiles extrêmes, vis-à-vis des fortes salinités, est extrêmement pertinente dans ce type d'habitat extrême.

IV. Stabilité des ARNs en condition hypersalé.

En condition hypersalée, qu'il s'agisse de milieu thalassique ou de milieu athalassique, la recherche d'un marqueur génétique pour témoigner d'une activité cellulaire est importante. En effet Hallsworth et collaborateurs (2007) (Hallsworth et al., 2007) démontrent par leurs travaux sur un environnement athalassique contenant 5 M de $MgCl_2$ que les acides désoxyribonucléiques (Watve et al., 2000) d'une souche de *Marinobacter* restent stables dans un milieu. Ils démontrent de plus que l'ARNr 16S peut être rétro-transcrit après 45 jours d'incubation dans ces conditions. Par contre les ARNm sont très vite dégradés suggéré en particulier par l'absence d'amplification à partir des ARNm de la sous-unité de la gyrase B, après 24 heures d'incubation.

Nous nous sommes inspirés de ces travaux préliminaires en réalisant une expérience similaire à la différence que notre choix s'est porté sur l'ajout de NaCl plutôt que $MgCl_2$ afin de simuler des conditions thalassiques. La souche que nous avons utilisé est une méthanogène méthylotrophe halophile modérée et isolée dans ce travail de thèse à partir du bassin thalassique Tyro (souche SLHTYRO, Cf. chapitre II.3). La souche a été incubée pendant 45 jours à une température de 15°C et à pression atmosphérique dans un milieu minimum à 300 g.L⁻¹ de NaCl ne contenant pas de matière organique. Les ARNs totaux ont été extraits au cours du temps et rétro-transcrits en ARNrc 16S et les ARNmc du gène *mcrA* (figure 68).

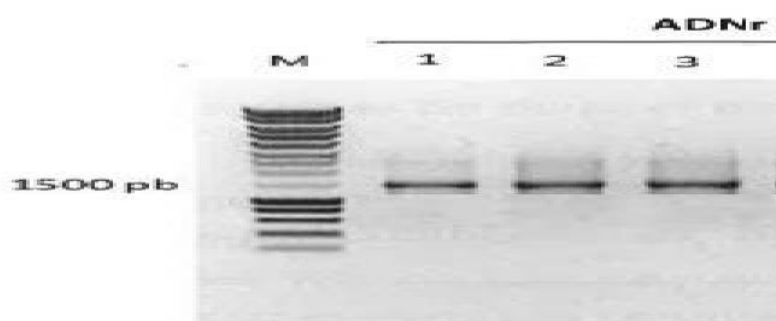


Figure 68 : Gel électrophorétique de vérification des amplifications par RT-PCR à partir des matrices d'ARN totaux correspondant aux ARNr 16S et ARNm du gène *mcrA* de la souche SLHTYRO placée dans un milieu contenant 300 g.L^{-1} de NaCl. Les ARNs ont été rétro-transcrits à l'aide d'amorces spécifiques de l'ADNr 16S et du gène *mcrA*, puis amplifiés par PCR. M : marqueur de taille (1 kb ladder, Promega). 1 : 0 jour ; 2 : 1 jour ; 3 : 7 jours ; 4 : 15 jours ; 5 : 30 jours ; 6 : 45 jours. + : contrôle positif. Chaque dépôt des produits de RT-PCR est de $5 \mu\text{L}$. Les bandes positives visibles sur le gel électrophorétique ont une taille attendue de 1500 pb et 800 pb pour l'ADNr 16S et le *mcrA* respectivement.

Les résultats des étapes d'amplification de l'ADNr 16S sont en adéquation avec les résultats de Hallsworth et collaborateurs (2007). En effet, après une période de 45 jours dans des conditions « thalassiques » riches en NaCl, nous sommes capables de rétro-transcrire l'ADNr 16S et d'obtenir une bande spécifique de l'ADNr 16S de 1500 pb. Cependant nos résultats diffèrent sur la rétro-transcription des ARNm (*mcrA*). Dans nos conditions, après 45 jours d'incubation, la rétro-transcription des ARNm du *mcrA* est possible alors qu'au bout de 24 heures l'ARNm de la gyrase B n'est pas amplifié dans l'expérience de Hallsworth. La stabilité des signaux obtenus suggèrent que les ARNs sont peu ou faiblement dégradés au cours des 45 jours de l'incubation. Il est rappelé que la souche SLHTYRO n'est pas capable de se développer à 300 g.L^{-1} de NaCl et que le milieu ne contient pas de substrat permettant la méthanogénèse.

Nos résultats démontrent donc que les ARNs sont peu dégradés après 45 jours d'incubation en condition hypersalée (i.e. 300 g.L^{-1} de NaCl) et que les ARNm (pour le *mcrA*) sont amplifiables jusqu'à 45 jours d'incubation. Ces résultats suggèrent que dans un milieu « thalassique » hypersalé en NaCl, les résultats obtenus sur une activité cellulaire basée sur l'analyse des ARNm et son interprétation sont spéculatifs.

Comme nous l'avons développé dans l'introduction, des bactéries et des archées piégées dans des cristaux de sels datant de 100 à 250 millions d'années respectivement ont été cultivées (Vreeland et al., 2000, Vreeland et al., 2007). Nos connaissances des facteurs permettant aux microorganismes de préserver leur matériel biologique et génétique sur des temps aussi longs

sont encore inconnus. Des mécanismes de réparation, de maintien de l'intégrité cellulaire, et de survie sont certainement employés par les microorganismes pour permettre leurs viabilités.

Il serait intéressant de poursuivre l'analyse de la stabilité des ADNs et ARNs en conditions hypersalées en testant différentes souches bactériennes et archéennes, halotolérantes, halophiles modérées et halophiles extrêmes. Ces expériences pourraient mettre en évidence la capacité des microorganismes halophiles à préserver leur intégrité génétique dans des conditions de fortes salinités.

V. Etude des génomes des souches appartenant au genre *Methanohalophilus*.

Les 3 souches appartenant au genre *Methanohalophilus* que nous avons isolé (SLHTYRO, SLHKRYOS, SLHTHETIS) présentent des caractéristiques physiologiques différentes des espèces types du genre en particulier : i) température optimale de croissance, ii) gamme de salinité et ii) croissance sous pression hydrostatique. L'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S et du gène *mcrA* ne permettent pas de démontrer une origine ancestrale des 3 souches. L'origine de ces microorganismes dans les bassins hypersalés profonds et anoxiques reste énigmatique : i) ont-ils été piégés lors de la formation des cristaux de sels, ii) ont-ils été déposés dans ces bassins par les courants marins ou iii) sont-ils présents dans la biosphère souterraine?

Nous avons entrepris de séquencer le génome de ces 3 souches afin d'explorer le potentiel génétique de ces 3 souches et de comparer leurs génomes avec les génomes des souches types du genre *Methanohalophilus*. Le génome de *M. mahii* étant déjà disponible, nous avons entrepris le séquençage de *M. halophilus* et de *M. portucalensis*. Le génome de *M. halophilus* a été publié dans la revue « Genome Announcements » (L'Haridon et al., 2017 sous presse) et correspond au premier article de ce chapitre. L'article présentant d'une part le génome de *M. portucalensis* et une analyse comparative avec les génomes de *M. mahii* et *M. halophilus* est en cours de préparation et présenté à la suite. La revue ciblée est le journal « Genome Biology and Evolution » section « Genome Report ».

Les résultats des séquençages des génomes des souches *M. halophilus* et *M. portucalensis* en utilisant une combinaison de techniques de séquençages nous ont permis de

circulariser ces génomes. Les mêmes approches ont été utilisées pour les 3 souches isolées de bassins hypersalés de la Mer Méditerranée mais les résultats obtenus ne nous ont pas permis de circulariser ces génomes. Les derniers résultats de séquençage selon la technologie *PacBio* ont été obtenus en novembre 2016 et sont donc en cours de traitement. Les résultats préliminaires sont présentés dans ce chapitre.

V.1. Annonce du génome de *Methanohalophilus halophilus* DSM 3094^T (Genome Announcements, article sous presse).

Complete genome sequence of *Methanohalophilus halophilus* DSM 3094^T, isolated from a cyanobacterial mat and bottom deposits at hamelin pool, shark bay, northwestern Australia.

Stéphane L'Haridon^{a,b,c}, Erwan Corre^d, Yue Guan^e, Manikandan Vinu^e, Violetta La Cono^f, Mickail Yakimov^f, Ulrich Stingl^e, Laurent Toffin^{c,a,b}, Mohamed Jebbar^{a,b,c*}

Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)-UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Plouzané, France^a; CNRS, IUEM-UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Plouzané, France^b; Ifremer, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Plouzané, France^c; Université Pierre et Marie Curie, CNRS, Station Biologique de Roscoff, Plateforme ABiMS, F-29688 Roscoff, France^d; Red Sea Research Center, King Abdullah University of Science and Technology, 23955-6900, Thuwal, Saudi Arabia^e; Institute for Coastal Marine Environment CNR, 98122 Messina, Italy^f.

***Corresponding author:** Mohamed Jebbar, Mohamed.jebbar@univ-brest.fr

Abstract

The complete genome sequence of *Methanohalophilus halophilus* DSM 3094^T, a member of the *Methanosarcinaceae* family, and the *Methanosarcinales* order, consists of 2,022,959-bp in one contig and encodes 2137 predicted genes. The genome is consistent with a halophilic methylotrophic anaerobic lifestyle including the methylotrophic and CO₂-H₂ methanogenesis pathways.

Keywords: Methanogen, *Methanohalophilus*, methylotrophy, halophile

Full text

Methanohalophilus halophilus strain Z-7982 (DSM 3094^T, OCM 160, NBRC 107633) was isolated from a cyanobacterial mat and bottom deposits at Hamelin Pool, Shark Bay, northwestern

Australia. It was first described as *Methanococcus halophilus* (Zhilina, 1983) before Wilharm and Co-workers transfer these strain to the genus *Methanohalophilus* (Wilharm et al., 1991). The strictly anaerobic strain Z-7982 is able to produce methane by reducing methylated compounds, and grows optimally at 30°C, pH 7 with 7% NaCl.

To gain insight into the role of methylotrophic methanogens in marine environments, the complete genome of *M. halophilus* was sequenced. The DNA extracted from strain Z-7982 was sequenced with 300 pb paired-end library using Illumina MiSeq (Bioscience Core Lab, King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, South Arabia) and a 100 bp paired-end library using Illumina HiSeq (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA). The 14, 356, 400 paired reads of 300 bp were quality trimmed (Q30) and *de novo* assembled into contigs using SPAdes version 3.6.1 (Nurk et al., 2013). The 75 resulting contigs were then scaffolded with SSPACES version 3.0 (Boetzer et al.) using the 51, 411, 253 paired ends reads of 100 bp. Finally a fully circularized genome was produced with an average coverage of approximately 4,724.

The genome of *M. halophilus* consists of a circular chromosome of 2,02 Mb with a G+C content of 42,39 %. A total of 2,137 protein-coding genes (CDS) were predicted with MaGe platform (Vallenet et al., 2006, Vallenet et al., 2013 2009) as well as one copy of the 16S-23S operon, two copies of 5S rRNA, 46 tRNA and 1 miscellaneous RNA. Additionally, the genome contains one Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat associated with CRISPR loci associated with *cas* gene (*cas1*).

Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) (Meyer et al., 2008, Overbeek et al., 2014) allowed the discovery of all core methanogenesis enzymes necessary for the conversion of methylated compounds to methane which is also supported by experimental microbial growth and methane production after addition of trimethylamine, dimethylamine, monomethylamine and methanol as sole carbon sources. It was recently suggested that *Methanohalophilus mahii* strain DAL1 (Lipus et al., 2016) has the genetic potential for hydrogenotrophic methanogenesis (conversion of CO₂ to methane). *M. halophilus* strain Z-7982 possesses also the core enzymes for CO₂ fixation, acetyl-CoA decarbonylase, tetrahydromethanopterin S-methyltransferase and methyl-coenzyme M reductase (*mcr*), but experimentally no growth was observed under CO₂ in *M. halophilus* strain Z-7982.

Accession number. This whole genome has been deposited at GenBank under the accession number CP017921.

ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013), project MaCuMBA under grant agreement 311975. The LABGeM (CEA/IG/Genoscope & CNRS UMR8030) and the France Génomique National infrastructure (funded as part of Investissement d'avenir program managed by Agence Nationale pour la Recherche, contract ANR-10-INBS-09) are acknowledged for support within the MicroScope annotation platform.

1. **Zhilina TN.** 1983. New obligate halophilic methane-producing bacterium. *Microbiology* **52**:290-297.
2. **Wilharm T, Zhilina TN, Hummel P.** 1991. DNA-DNA hybridization of methylotrophic halophilic methanogen bacteria and transfer of *Methanococcus Halophilus* to the genus *Methanohalophilus* as *Methanohaophilus halophilus* comb-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**:558-562.
3. **Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich A, Korobeynikov A, Lapidus A, Prjibelsky A, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, McLean J, Lasken R, Clingenpeel SR, Woyke T, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA.** 2013. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads, p 158-170. *In* Deng M, Jiang R, Sun F, Zhang X (ed), *Research in Computational Molecular Biology: 17th Annual International Conference, RECOMB 2013, Beijing, China, April 7-10, 2013 Proceedings*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
4. **Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W.** 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* **27**:578-579.
5. **Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S, Cruveiller S, Lajus A, Pascal G, Scarpelli C, Medigue C.** 2006. MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Research* **34**:53-65.
6. **Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, Le Fevre F, Longin C, Mornico D, Roche D, Rouy Z, Salvignol G, Scarpelli C, Smith AAT, Weiman M, Medigue C.** 2013. MicroScope-an integrated microbial resource for the curation and

comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Research* **41**:E636-E647.

7. **Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA.** 2008. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *Bmc Bioinformatics* **9**.
8. **Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia FF, Stevens R.** 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* **42**:D206-D214.
9. **Lipus D, Vikram A, Ross DE, Bibby K.** 2016. Draft Genome Sequence of *Methanohalophilus mahii* Strain DAL1 Reconstructed from a Hydraulic Fracturing-Produced Water Metagenome. *Genome announcements* **4**.

V.2. Annonce du génome de *Methanohalophilus portucalensis*.

Article en préparation pour une soumission dans le journal «Genome Biology and Evolution », catégorie « Genome report ».

Draft genome sequence of the halophilic methylotrophic methanogen Archeon *Methanohalophilus portucalensis* strain FDF-1^T and a genome comparison with *M. mahii* strain SLP^T and *M. halophilus* strain Z-7982^T.

Stéphane L'Haridon^{a,b,c}, Erwan Corre^d, Yue Guan^e, Manikandan Vinu^e, Violetta La Cono^f, Mickail Yakimov^f, Ulrich Stingl^e, Laurent Toffin^{c,a,b}, Mohamed Jebbar^{a,b,c}

Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)-UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Plouzané, France^a; CNRS, IUEM-UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Plouzané, France^b; Ifremer, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Plouzané, France^c; Université Pierre et Marie Curie, CNRS, Station Biologique de Roscoff, Plateforme ABiMS, F-29688 Roscoff, France^d; Red Sea Research Center, King Abdullah University of Science and Technology, 23955-6900, Thuwal, Saudi Arabia^e; Institute for Coastal Marine Environment CNR, 98122 Messina, Italy^f.

Abstract

The genus *Methanohalophilus* comprised four validated species *M. mahii* strain SLP^T, *M. Halophilus* strain Z-7982^T, *M. portucalensis* strain FDF-1^T and *M. levihalophilus* strain GTA13^T and until today only the genome of *M. mahii* and *M. halophilus* are available. In the first part, the present study describes the draft genome sequence (2.01 Mb) of *Methanohalophilus portucalensis* DSM 7471^T a halophilic methylotrophic methanogen isolated from sediment of salinarium in Figueira da Foz, Portugal. In a second part, the genome of *M. portucalensis*, *M. mahii* and *M. halophilus* are compared and analysed. This is the fourth genome report of the *Methanohalophilus* genus, within the *Methanosarcinaceae* family, in the *Methanosarcinales* order.

Materials and Methods

Archaeal strain.

Methanohalophilus portucalensis strain FDF-1^T was isolated from sediments from a salinarium in Figueira da Foz, Portugal (Boone et al., 1993). The strain was obtained from the DSMZ microbial microorganism collection under the collection number 7471^T and cultivated under the preconservation of the DSMZ culture collection at 37°C with trimethylamine as substrate.

Genome Sequencing and Assembly of *M. portucalensis* strain FDF-1^T

The complete genome of *M. portucalensis* was sequenced with a combination of three sequencing libraries. A 300 pb paired-end library sequenced on an Illumina MiSeq (Bioscience Core Lab, King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, South Arabia) and a 100 pb paired-end library sequenced on an Illumina HiSeq (Illumina, Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA) and a PacBio RS library (Genotoul, Toulouse). The 13 835 892 paired reads of 300 pb were quality trimmed (Q30) and de novo assembled into contigs using SPAdes version 3.6.1 (Nurk et al., 2013). The 17 resulting contigs were then scaffolded with SSPACES version 3.0 (Boetzer et al.) using the 60 686 211 paired ends reads of 100 pb, leading to an intermediate version of the assembly with 9 scaffolds. A final step of scaffolding was performed using SSPACE LongRead v1.1 (Boetzer and Pirovano) with the 317,258 PacBio RS filtered subreads. We obtained finally 3 scaffolds for total number of 2,084,275 bases (without underdetermined base) and an average coverage of approximately 5,300. Finally a fully circularized version of the genome with expected gap between oriented scaffolds was produced with comparison with *M. mahii* genome using CONTIGuator (Galardini et al., 2011).

Results

Genome Features

The *M. portucalensis* genome consists of a circular chromosome of 2,084,875 bp with a GC content of 41.95 %. A total of 2,198 coding DNA sequences (CDS) were identified with the MaGe platform (Vallenet et al., 2006, Vallenet et al., 2009, Vallenet et al., 2013) as well as two copy of the 16S-23S operon, three copies of 5S rRNA, 46 tRNA and 4 miscellaneous RNA. This whole genome has been deposited at GeneBank under the accession number CP017881. The table 1 synthesises the genome statistics of the three genomes available.

Table 1: Genome Statistics

Species	<i>M. portucalensis</i>	<i>M. mahii</i>	<i>M. halophilus</i>
Attribute	Value	Value	Value
Genome size (bp)	2,084,875	2, 012,424	2,022,959
DNA G+C content (%)	41,95	42,62	42,40
Number of replicons	1	1	1
Total genes	2257	2095	2190
RNA genes	55	62	50
Ribosomal rRNA 16S rRNA	2	3	1
Ribosomal rRNA 23S rRNA	2	3	2
Ribosomal rRNA 5S rRNA	3	3	2
Protein-coding genes	2202	2032	2137
Genes with function prediction	1343	2041	1400
Genes inparalog clusters	265		
Genes assigned to COGs	1734	1596	1722
Genes assigned pfam domains	1629		
Genes with signal peptides	204		
CRISPR	6	1	1

ANI and DDH scores.

The genome size of *M. portucalensis* is close to the other type species *M. mahii* strain SLP^T (2,012,424 bp) (Spring et al., 2010)) and *M. halophilus* strain Z-7982^T (2,022,959 bp) (L'Haridon, *in press*). *Methanohalophilus mahii*, *M. halophilus* and *M. portucalensis* are physiologically very

similar and the separation in three different species was previously based on DNA reassociation, electrophoretic analysis of whole-cells proteins and also to continue to maintain the genus *Methanohalophilus* for taxonomic stability (Boone et al., 1993). The availability of the three genomes allows determining using ANI calculator (Goris et al., 2007) and the *in silico* DNA-DNA hybridization that these three strains represent with no ambiguities three different species. The Average Nucleotide Identity scores is 92.2% (SD: 3.41) between *M. halophilus* and *M. portucalensis*; 92.59% (SD: 2.73) between *M. halophilus* and *M. mahii* and 90.98% (SD: 3.02) between *M. mahii* and *M. portucalensis*. ANI score below 95% has been defined for the delineation of a new species. In a second step, we calculated the *in silico* DNA-DNA hybridization (DDH) using the genome-to-genome distance calculator GGDC2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013) which indicate a value of 44.8% between *M. halophilus* and *M. mahii*, 44.4% between *M. portucalensis* and *M. mahii* and 50.50% between *M. halophilus* and *M. mahii*. All the DDH values indicated are obtained using the formula 2, which is the formula recommended. Previous data of DNA-DNA hybridization *in vitro* (Deley et al., 1970, Huss et al., 1983) performed at the DSMZ revealed similarity values of 68.4% and 63.9% between *M. mahii* and *M. portucalensis*, 71.5% and 73.7% between *M. mahii* and *M. halophilus* and 60.5% and 69.8% between *M. halophilus* and *M. portucalensis* (measurement in duplicate, personal data). Our results confirm that the three species are genetically very closed and based on the ANI value and DDH hybridization *M. mahii*, *M. halophilus* and *M. portucalensis* represent three different species which was not obvious looking to the results of DNA-DNA hybridization.

Pan genome and Core genome.

The microbial genome is composed of 2 distinct genomic components, the core and variable genome, together called the pan-genome (Medini et al., 2005). The core genome is composed of genes that are common to all strains and held stable through conservation. The variable genome is composed of genes not found in all strains, either because genes are gained through horizontal gene transfer or because they are differentially lost. Every unique microbial strain sequenced contains a different suite of variable genes. The distribution of these variable genes among strains, the sources of genetic material, and the rates at which genes are acquired and lost are unknown. It is largely believed that the variable gene component extends the physiological and ecological capabilities of microbial cells. The pan-genome of the three species *M. halophilus*, *M. portucalensis* and *M. mahii* consists of 6,485 gene families. The core genome

consisted of 4,929 gene families which were shared by the three genomes; the deduced variable genome represented 1,556 gene families. The core CDS consisted of 1,634 genes which represent around 76% of the CDS of the three different species. Based on the DDH and CDS core values, the three strains changed comparatively little in gene content but more in nucleotide sequences. The species specific CDS represent 311 genes for *M. halophilus*, 360 for *M. mahii* and 402 for *M. portucalensis*.

Methanogenesis

Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) (Meyer et al., 2008, Overbeek et al., 2014) and MicroCyc tool available on the MaGe platform (Vallenet et al., 2006, Vallenet et al., 2009, Vallenet et al., 2013) allowed the discovery of all core methanogenesis enzymes necessary for the conversion of methyl compound to methane which is also supported by experimental microbial growth under Trimethylamine, Dimethylamine, Monomethylamine and Methanol. It was recently suggested that *Methanohalophilus mahii* strain DAL1 (Lipus et al., 2016) has the genetic potential for hydrogenotrophic methanogenesis (conversion of CO₂ to methane). We investigate the genetic potential for hydrogenotrophic growth in *M. halophilus* strain Z-7982^T, *M. mahii* strain SLP^T and *M. portucalensis* FDF-1^T. All core methanogenesis pathway for the conversion of CO₂ to methane was revealed in the three genomes: the process of methanogenesis from CO₂ starts with activation of the CQ by the unique cofactor methanofuran, resulting in the formation of formyl-methanofuran. The formyl group is then transferred to another cofactor, tetrahydromethanopterin. A succession of transformations, catalyzed by methenyl-H₄MPT cyclohydrolase, H₂-forming methylene-H₄MPT dehydrogenase, and finally F₄₂₀-dependent methylene-H₄MPT reductase, which depends on the methanogenic cofactor F₄₂₀, results in the formation of 5-methyl-tetrahydromethanopterin. The methyl group is then transferred by methyl-H₄MPT:coenzyme M methyltransferase to coenzyme M, resulting in methyl-CoM, which is then disproportionated into methane and CO₂. All the enzymes for the conversion of CO₂ to methane were identified in the three genomes but until now no growth under CO₂ has been observed for *M. halophilus* strain Z-7982^T, *M. mahii* strain SLP^T and *M. portucalensis* FDF-1^T.

Compatible solutes

In the “Salt-out” strategy, microorganisms synthesize compatible solute such as glycine betaine to overcome the extracellular salt stress. *Methanohalophilus portucalensis* strain FDF-1^T was the first organism of the class of obligate halophilic methanogenic Archaea in which the synthesis and uptake of glycine betaine was examined (Lai et al., 2000). This organism is able to synthesize glycine betaine *de novo*, but if this solute is present in the culture medium uptake is preferred over *de novo* synthesizes. *M. portucalensis* synthesize glycine betaine from glycine through a series of methylation reactions. The enzymes performing the methylation reactions have been characterized in some of these organisms, and were found to be two methyltransferases, glycine-sarcosine methyltransferase (GSMT) and sarcosine-dimethylglycine methyltransferase (SDMT). The analysis of the genome of *M. halophilus* and *M. mahii* revealed the presence of the same enzymes. The glycine betaine is imported into *Methanohalophilus portucalensis* via a member of the ABC transporter superfamily and consists of an integral membrane protein (OpuAB), and a substrate binding-protein (OpuAC). A second transporter, OpuD, a membrane protein mediated glycine betaine transport in the cells is identified in the genome of *M. portucalensis*. OpuD belongs to the Betaine/carnitine/choline transporters (BCCT) family that are found in Gram negative, Gram positive Bacteria and Archaea (Ziegler et al., 2010). It has been shown that the activity of this transporter in *B. subtilis* was controlled by the environmental osmolarity (Kappes et al., 1996). High osmolarity stimulates *de novo* synthesis of OpuD and activates pre-existing OpuD proteins to achieve maximal glycine betaine uptake activity also present (Kappes et al., 1996). The presences of OpuAB, OpuAC and OpuD have been revealed in the genome of *M. mahii* and *M. halophilus*.

Discussion

Methanohalophilus portucalensis strain FDF-1^T (DSM 7471^T, OCM 59) was described as a new species of the genus *Methanohalophilus* by Boone and Co-workers (Boone et al., 1993). In the same study, the taxonomy of *M. mahii* and *M. halophilus* were investigated and revealed that the two strains are physiologically very similar and could be considered as subjective synonyms. Value of DNAs reassociation of 52% between these two strains and the electrophoretic analysis of whole-cell proteins which indicated major differences in the proteins content suggest that unknown physiological differences exist (Boone et al., 1993). It was proposed to maintain these two strains as two different species and also in the interest of taxonomic stability in order to conserve the

genus *Methanohalophilus* as *Methanohalophilus mahii* was the type species of the genus (Paterek and Smith, 1988) but *M. halophilus* was described before (Zhilina, 1983). Based on the analysis of the genomes of the three species, we confirmed that *M. halophilus* strain Z-7982^T and *M. mahii* strain SLP^T, based on ANI and DDH scores, are two separate taxa. Genome analysis pointed out that the organisation of the three genomes are highly conserved and revealed also the high degree of gene conservation with more than 76% of the CDS shared between the three taxa.

M. mahii strain SLP^T was isolated from the Great Salt Lake (USA), *M. halophilus* strain Z-7982^T was isolated from a cyanobacterial mat and bottom deposits, Shark bay (Australia) and *M. portucalensis* strain FDF-1^T was isolated from a salinarium at Figueira da Foz (Johnson et al.). The biogeographical origin of these three strains with distance of more than 8,000 km between the three places of isolation represent geographical barriers. Geographical barriers are known to promote genetics divergence among population (Whitaker et al., 2003). We observed that the genetic potential of these three species is highly conserved in term of gene content and organisation. The presence of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) has been identified in the three genomes. CRISPRs are known to confers resistance to foreign genetic elements such as those present within plasmids and phages and could explained the high level of conservation of the three genomes by cutting the exogenous DNA (Horvath and Barrangou, 2010).

ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013), project MaCuMBA under grant agreement 311975. The LABGeM (CEA/IG/Genoscope & CNRS UMR8030) and the France Génomique National infrastructure (funded as part of Investissement d'avenir program managed by Agence Nationale pour la Recherche, contract ANR-10-INBS-09) are acknowledged for support within the MicroScope annotation platform.

Reference

1. **Boone DR, Mathrani IM, Liu YT, Menaia J, Mah RA, Boone JE.** 1993. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF METHANOHALOPHILUS-PORTUCALENSIS SP-NOV AND DNA

- REASSOCIATION STUDY OF THE GENUS METHANOHALOPHILUS (VOL 43, PG 431, 1993).
International Journal of Systematic Bacteriology **43**:867-867.
2. **Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich A, Korobeynikov A, Lapidus A, Prjibelsky A, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, McLean J, Lasken R, Clingenpeel SR, Woyke T, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA.** 2013. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads, p 158-170. *In* Deng M, Jiang R, Sun F, Zhang X (ed), Research in Computational Molecular Biology: 17th Annual International Conference, RECOMB 2013, Beijing, China, April 7-10, 2013 Proceedings. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
 3. **Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W.** 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* **27**:578-579.
 4. **Boetzer M, Pirovano W.** 2014. SSPACE-LongRead: scaffolding bacterial draft genomes using long read sequence information. *Bmc Bioinformatics* **15**.
 5. **Galardini M, Biondi EG, Bazzicalupo M, Mengoni A.** 2011. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code for Biology and Medicine* **6**:11.
 6. **Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S, Cruveiller S, Lajus A, Pascal G, Scarpelli C, Medigue C.** 2006. MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Research* **34**:53-65.
 7. **Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L, Lajus A, Rouy Z, Roche D, Salvignol G, Scarpelli C, Medigue C.** 2009. MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database-the Journal of Biological Databases and Curation*.
 8. **Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, Le Fevre F, Longin C, Mornico D, Roche D, Rouy Z, Salvignol G, Scarpelli C, Smith AAT, Weiman M, Medigue C.** 2013. MicroScope-an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Research* **41**:E636-E647.
 9. **Spring S, Scheuner C, Lapidus A, Lucas S, Del Rio TG, Tice H, Copeland A, Cheng JF, Chen F, Nolan M, Saunders E, Pitluck S, Liolios K, Ivanova N, Mavromatis K, Lykidis A, Pati A, Chen A, Palaniappan K, Land M, Hauser L, Chang YJ, Jeffries CD, Goodwin L, Detter JC, Brettin T, Rohde M, Goker M, Woyke T, Bristow J, Eisen JA, Markowitz V, Hugenholtz P, Kyrpides NC, Klenk HP.** 2010. The Genome Sequence of *Methanohalophilus mahii* SLPT Reveals Differences in the Energy Metabolism among Members of the Methanosarcinaceae Inhabiting Freshwater and Saline Environments. *Archaea-an International Microbiological Journal*.
 10. **Goris J, Konstantinidis K, Klappenbach J, Coenye T, Vandamme P, Tiedje J.** 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**.

11. **Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M.** 2013. GBDP on the grid: a genome-based approach for species delimitation adjusted for an automated and highly parallel processing of large data sets, Hochleistungsrechnen in Baden-Württemberg - Ausgewählte Aktivitäten im bwGRiD 2012. KIT Scientific Publishing, Karlsruhe.
12. **Deley J, Cattoir H, Reynaert.A.** 1970. QUANTITATIVE MEASUREMENT OF DNA HYBRIDIZATION FROM RENATURATION RATES. *European Journal of Biochemistry* **12**:133-&.
13. **Huss VAR, Festl H, Schleifer KH.** 1983. STUDIES ON THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF DNA HYBRIDIZATION FROM RENATURATION RATES. *Systematic and Applied Microbiology* **4**:184-192.
14. **Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R.** 2005. The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**:589-594.
15. **Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA.** 2008. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *Bmc Bioinformatics* **9**.
16. **Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia FF, Stevens R.** 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* **42**:D206-D214.
17. **Lipus D, Vikram A, Ross DE, Bibby K.** 2016. Draft Genome Sequence of *Methanohalophilus mahii* Strain DAL1 Reconstructed from a Hydraulic Fracturing-Produced Water Metagenome. *Genome announcements* **4**.
18. **Lai MC, Hong TY, Gunsalus RP.** 2000. Glycine betaine transport in the obligate halophilic archaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *J Bacteriol* **182**.
19. **Kappes RM, Kempf B, Bremer E.** 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: Characterization of OpuD. *Journal of Bacteriology* **178**:5071-5079.
20. **Paterek JR, Smith PH.** 1988. METHANOHALOPHILUS-MAHII GEN-NOV, SP-NOV, A METHYLOTROPHIC HALOPHILIC METHANOGEN. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**:122-123.
21. **Zhilina TN.** 1983. NEW OBLIGATE HALOPHILIC METHANE-PRODUCING BACTERIUM. *Microbiology* **52**:290-297.
22. **Johnson LS, Eddy S, Portugaly E.** 2010. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC Bioinform* **11**.

23. **Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW.** 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**:976-978.
24. **Horvath P, Barrangou R.** 2010. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* **327**:167-170.

V.3. Présentation des génomes des souches *M. SLHTYRO*, *M. SLHKRYOS* et *M. SLHTHETIS* isolées des bassins hypersalés profonds et anoxiques Tyro, Kryos et Thetis de la Mer Méditerranée.

Le séquençage des génomes de *M. halophilus* et *M. portucalensis* en utilisant les techniques de séquençage illumina Mate-pair et *ion Torrent* ont permis de circulariser rapidement le génome de *M. halophilus*. Le génome de *M. portucalensis* qui comprenait 7 contigs a lui aussi été circularisé en se basant sur le génome de *M. mahii* pour assembler et orienter les contigs. L'utilisation des mêmes outils pour les souches *M. SLHTYRO*, *M. SLHKRYOS* et *M. SLHTHETIS* n'apportait pas les mêmes résultats et l'ensemble des logiciels disponibles ne parvenait pas à diminuer le nombre de contigs (> à 20). Nous avons choisi de tester la technologie de séquençage *PacBio* sur ces 3 souches. Au moment de l'écriture du manuscrit, seuls les résultats de séquençage selon cette technologie ont été obtenus pour *M. SLHTYRO* et *M. SLHKRYOS*. Les résultats pour *M. SLHTHETIS* sont attendus pour fin janvier 2017.

Une synthèse de l'analyse des génomes est présentée dans le tableau 14.

Tableau 14 : Caractéristiques principales des génomes de *M. SLHTYRO*, *M. SLHKRYOS* et *M. SLHTHETIS*.

	<i>M. SLHKRYOS</i>	<i>M. SLHTYRO</i>	<i>M. SLHTHETIS</i>
Taille du génome (pb)	1 890 430	1 841 429	1 719 361
G + C %	42,5	42,7	42,9
Nombre de contigs	7	7	23
Nombre de CDS	2072	2027	1896
Nombre de RNAs	59	59	51
Nombre de CRISPR	7	0	3

Tableau 15: Caractéristiques principales des génomes de *M. mahii*, *M. halophilus* et *M. portucalensis*.

	<i>M. mahii</i>	<i>M. portucalensis</i>	<i>M. halophilus</i>
Taille du génome (pb)	2 012 424	2 084 875	2 022 959
G + C %	42,6	41,9	42,4
Nombre de contigs	1	1	1
Nombre de CDS	2074	2143	2072
Nombre de RNAs	61	55	54
Nombre de CRISPR	1	6	1

La première lecture des deux tableaux 14 et 15 nous indique que les génomes des souches isolées des DHABs sont plus petits (environ 1,8 Mb) par rapport aux génomes des souches terrestres (2 Mb) ce qui représente une différence d'environ 10%. Le contenu en G+C % est très proche entre les souches du genre ainsi que le nombre de séquences codantes (CDS) qui se situe autour de 2000. Le nombre de répétitions CRISPR dans les différentes souches varie. Et on note un nombre important de CRISPR chez *M. portucalensis* et *M. SLHKRYOS* par rapport aux autres souches. Les CRISPRs découverts dans les génomes de *Methanohalophilus* correspondent aux familles CRISPR/cas et des sous-types CRISPR/csh. Le système CRISPR/cas correspond au mécanisme de défense contre les phages et les plasmides invasifs.

Les analyses phylogénétiques réalisées sur les séquences complètes d'ADNr 16S ont révélées les fortes similitudes entre les souches du genre *Methanohalophilus* (> 99,6%). Ces fortes valeurs ne permettent pas de les décrire comme nouvelles espèces par rapport aux critères de définition de l'espèce (≥98,7% de similarité de séquences de l'ADNr 16S). Dans le cas de fortes similitudes de l'ADNr 16S (≥98,7%), la notion d'espèce peut s'appuyer sur les résultats une hybridations ADN/ADN *in vitro*, sur une hybridation ADN/ADN *in silico* (DDH) et sur les détermination des valeurs d'identité nucléotidiques moyennes (ANI). Les génomes des différentes souches étant disponibles nous avons calculé les valeurs d'ANI et de DDH.

- Détermination des valeurs d'identité nucléotidiques moyennes (ANI).

Le résultat des valeurs ANI sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16: Valeurs d'identités nucléotidiques (ANI) pour les souches du genre *Methanohalophilus*.

	<i>M. mahii</i>	<i>M. halophilus</i>	<i>M. portucalensis</i>	<i>SLHTYRO</i>	<i>SLHTHETIS</i>
<i>M. halophilus</i>	90.95% (SD: 3.48%)				
<i>M. portucalensis</i>	90.75% (SD: 3.32%)	92.43% (SD: 2.90%)			
<i>SLHTYRO</i>	90.91% (SD: 3.20%)	92.34% (SD: 2.85%)		94.16% (SD: 2.98%)	
<i>SLHTHETIS</i>	90.92% (SD: 3.20%)	92.38% (SD: 2.83%)		94.17% (SD: 2.95%)	98.33% (SD: 2.35%)
<i>SLHKRYOS</i>	90.94% (SD: 3.45%)	99.97% (SD: 0.07%)		92.41% (SD: 2.96%)	92.36% (SD: 2.82%)
	92.39% (SD: 2.79%)				

Les valeurs d'ANI calculées nous indiquent que la souche *M. SLHKRYOS* appartient à l'espèce *M. halophilus*. En effet, le seuil de l'espèce selon cette méthode est de 95% (Konstantinidis and Tiedje, 2005), la valeur de 99,97 % ne permet donc pas de les différencier en deux espèces distinctes. Les souches *M. SLHTYRO* et *M. SLHTHETIS* sont proches de l'espèce *M. portucalensis* avec des valeurs de similitude de 94% et un écart type proche de 3. Les souches *M. SLHTYRO* et *M. SLHTHETIS* appartiendraient à la même espèce.

- Hybridation ADN/ADN *in silico*.

L'hybridation ADN/ADN (DDH) fournit une évaluation de la similitude globale de l'ADN génomique entre deux espèces ; par définition, si la DDH est supérieure ou égale à 70%, les deux ADN appartiennent à la même espèce (Colston et al., 2014). L'hybridation ADN/ADN a été effectuée *in silico* grâce au web serveur GGDC signifiant « genome to genome distance calculator » (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) (Auch et al., 2010a, 2010b; Meier-Kolthoff et al., 2014).

Les valeurs de DDH *in silico* entre *M. portucalensis* et *M. SLHTYRO* sont de 58%; entre *M. portucalensis* et *M. SLHTHETIS* de 58,1% ; entre *M. SLHTYRO* et *M. SLHTHETIS* de 86,2%. Les souches *M. SLHTYRO* et *M. SLHTHETIS* représentent une même et nouvelle espèce du genre *Methanophilus*. Les caractères physiologiques incluant la température optimale de croissance, la gamme de salinité pour la croissance, et la croissance sous pression hydrostatique soutiennent la

notion de nouvelles espèces pour *M. SLHTYRO* et *M. SLHTHETIS*. Le nom de *Methanohalophilus profundus* souche type SLHTYRO sera proposé lors de la publication de ce nouveau taxon.

➤ Comparaison des génomes

Comme nous l'avons souligné plus haut les génomes des souches isolées des DHABs sont plus petits d'environ 10%. Nous avons comparé les génomes de *M. halophilus* et *SLHKRYOS* ; de *M. portucalensis* et *M. SLHTYRO* ; de *M. Portucalensis* et *M. SLHTHETIS*, et *M. SLHTYRO* avec *M. SLHTHETIS* en utilisant l'outil « compare » dans RAST. Le but de cette analyse était d'identifier les régions ou fonctions du génome qui ont disparu entre les différentes souches.

La comparaison des génomes de *M. halophilus* et *M. SLHKRYOS* a permis de mettre en lumière plusieurs aspects écologiques importants. Plusieurs enzymes qui interviennent dans les mécanismes de réponses au stress sont absents chez *M. SLHKRYOS* : la catalase, la peroxydase et le phytochrome (Complexe histidine/ kinase). Les DHABs sont des environnements très réduits dans lesquels l'oxygène est consommé très rapidement au niveau de l'interface haute de l'halocline. On peut supposer que l'habitat des DHABs limite le contact et donc le stress des cellules de *Methanohalophilus* avec l'oxygène par rapport aux *Methanohalophilus* isolées de milieu terrestre. L'absence de phytochrome, qui permet une réponse des cellules suite à un stress par exemple aux rayons UV, chez *M. SLHKRYOS* pourrait être corrélée aux conditions singulières des DHABs (absence de lumière). L'ensemble des gènes responsables de la mobilité cellulaire (flagelles par exemple) sont absents chez *M. SLHKRYOS*. Plusieurs gènes codants pour les enzymes permettant la fixation du C₄ et du métabolisme du glycogène sont absents des génomes analysés. La production de glycogène chez les microorganismes leur permet d'utiliser le glycogène stockée à des fins énergétiques notamment dans le cas de stress associés à l'absence de source carbonée, ou de carence d'un élément important pour leur métabolisme. L'absence des gènes codants pour les enzymes nécessaires à la synthèse de glycogène suggère soit que l'environnement fourni l'ensemble des besoins nutritionnelles de la souche soit que le stockage de glycogène est trop coûteux au niveau énergétique pour la cellule.

La réduction de la taille d'un génome d'un microorganisme permet de limiter la dépense énergétique engendrée par la réplication de l'ADN, d'éliminer des processus métaboliques coûteux au niveau énergétique qui produiraient des molécules ou substrats qui sont disponibles dans l'environnement. Au regard des gènes qui ne sont pas présents chez *M. SLHKRYOS*, il

semble que la réduction de la taille du génome soit guidée par le contexte de son habitat naturel (en particulier environnement réduit et absence de lumière). Ainsi par exemple les gènes codant pour la catalase, la peroxydase et le phytochrome ne sont plus présents dans le génome de *M. SLHKRYOS*.

La comparaison des génomes de *M. portucalensis*, *M. SLHTYRO* et *M. SLHTHETIS* révèle que les génomes de *M. SLHTYRO* et *M. SLHTHETIS* ne possèdent pas non plus les gènes codant pour la catalase et la peroxydase.

L'analyse du génome de *SLHTHETIS* révèle l'absence du gène codant pour l'enzyme isocitrate déhydrogénase. Cette enzyme intervient dans le cycle TCA pour catalyser la production du α -ketoglutarate et est donc essentielle dans le fonctionnement du cycle. L'absence des gènes codant pour la phosphoenolpyruvate carboxylase, la pyruvate déhydrogénase et la pyruvate oxydase semble indiquer que la souche *M. SLHTHETIS* utiliserait d'autres voies métaboliques, comme cela a été mis évidence chez *M. maripaludis*. La souche méthanogène *M. maripaludis* ne possède pas non plus les gènes codant pour les enzymes isocitrate déhydrogénase, aconitate et citrate synthase. En absence de la phosphoenolpyruvate carboxylase, *M. maripaludis* convertie le pyruvate en oxaloacétate grâce à l'action de l'enzyme pyruvate carboxylase. L'oxaloacétate est ensuite convertie en α -ketoglutarate via une série d'intermédiaires (*i.e.* malate, fumarate, succinate, succinyl-CoA). L'absence du gène codant pour la phosphoenolpyruvate carboxylase dans le génome de la souche *SLHTHETIS* semble indiquer qu'une autre voie métabolique est utilisée ou que le cycle TCA est réduit chez cette souche. La souche *SLHTHETIS* est une souche à croissance très lente et difficile à cultiver. L'absence des gènes mentionnés ci-dessus pourrait expliquer la difficulté rencontrée pour cultiver cette souche par rapport aux souches *SLHKRYOS* et *SLHTHYRO*.

Le gène codant pour la déoxyribodipyrimidine photolyase est aussi absent du génome de la souche *M. SLHTHETIS*. Or cette enzyme intervient pour réparer les dommages de l'ADN et plus particulièrement des bases pyrimidines, engendrés par les rayonnements UV. Dans le contexte écologique des DHABs caractérisé par l'absence de lumière, l'absence du gène codant pour cette enzyme dans le génome pourrait correspondre à une adaptation du microorganisme à son environnement.

L'étude préliminaire des génomes analysés dans cette étude indique une réduction de la taille des génomes d'environ 10% pour les souches issues des DHABs par rapport aux autres souches appartenant au genre *Methanohalophilus* et isolées d'environnements terrestres. En comparant les génomes, nous avons noté l'absence des gènes codants pour les enzymes catalase, peroxydase, phytochrome (associé au complexe histidine/kinase) et de la déoxyribodipyrimidine photolyase dans le génome des souches isolées des DHABs. Le biotope dans lequel se développent les microorganismes des DHABs peut expliquer la stratégie de réduction de la taille du génome si les microorganismes doivent limiter les dépenses énergétiques pour survivre dans cet environnement extrême.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives.

Un des objectifs majeurs définis au début de la thèse était de cultiver les acteurs microbiens clés impliqués dans les processus majeurs, méthanogénèse et sulfato-réduction, mis en évidence dans les bassins profonds hypersalés anoxiques (DHABs) de la Mer Méditerranée. L'étude des DHABs de la Mer Méditerranée, par le biais de cultures d'enrichissement et d'isolement couplées à l'utilisation de techniques moléculaires démontre l'existence de communautés microbiennes halophiles vivantes. Des populations cultivables diversifiées ont été observées et correspondent à des microorganismes réalisant la sulfato-réduction et la méthanogénèse, caractéristiques de ces habitats. Les métabolismes observés sont compatibles avec les conditions de vie (pression, température, salinité) de ces microorganismes et la géochimie des bassins. Les tentatives infructueuses de stabiliser la culture d'enrichissement (Urania 26.6), composé de microorganismes sulfato-réducteurs représentant probablement un nouveau genre, sur la base de l'analyse de la séquence du gène ARNr 16S, ne permettent pas de démontrer formellement cette potentialité métabolique. Les milieux de cultures spécifiques montrent l'enrichissement de cellules correspondant souvent à de nouveaux genres microbiens (ex. : Thetis 21.8, Thetis 22.8, Thetis 30.7) mais impossible à maintenir en sous-culture par de multiples tentatives de repiquages dans les mêmes milieux d'enrichissement ou même en adaptant les conditions pour permettre leur isolement ultérieure. Une seule souche, Kryos 23.9, a été repiquée avec succès et isolée en culture pure. Bien que les conditions optimales de croissance de cette souche ne permettent pas d'atteindre des densités cellulaires adéquates pour sa caractérisation complète et son dépôt dans les collections internationales, son génome sera rapidement séquencé afin d'établir ses potentialités métaboliques et d'orienter la composition du milieu de culture optimale.

Les cultures d'enrichissements ciblant les quatre voies métaboliques de la méthanogénèse révèlent la présence de méthanogènes méthylotrophes halophiles viables probablement impliqués dans la production de méthane en milieu hypersalé. Les substrats méthylés sont des substrats dits non compétitifs en milieu hypersalé pour les microorganismes méthanogènes. Les souches méthanogènes halophiles ont été isolées de trois bassins, deux bassins thalassiques (Thetis et Tyro) et d'un bassin athalassique (Kryos) et sont affiliées au genre *Methanohalophilus*. La caractérisation morphologique, phénotypique et moléculaire de ces trois isolats a été réalisée. L'établissement des conditions *in situ* des bassins (température 14°C), pression (35 MPa), salinité (120 g.L⁻¹ NaCl) au laboratoire permet la croissance de ces souches. L'analyse préliminaire

réalisée sur le bassin Tyro à l'aide d'outils moléculaires (rétro-transcription des ARNr 16S) suggère la présence de souches métaboliquement « actives » et affiliées à 99% avec *Methanohalophilus portucalensis*. Les croissances sous pression hydrostatique des 3 isolats ont été comparées avec 3 des espèces types du genre *M. mahii*, *M. portucalensis*, *M. halophilus*. Les résultats démontrent que les trois souches isolées des bassins profonds sont piezophiles, c'est-à-dire montrant une meilleure croissance en pression hydrostatique (35 MPa condition *in situ*) plutôt qu'à la pression atmosphérique. A l'inverse, les espèces types du genre, isolées d'habitats terrestres ne montrent pas un comportement piezophile, préférant une pression atmosphérique pour leur croissance.

Le résultat de séquençage des génomes de trois souches isolées au cours de ce travail de thèse et de deux génomes des espèces types du genre *Methanohalophilus* terrestre (*M. portucalensis* et *M. halophilus*, le génome de *M. mahii* était déjà disponible) suggère plusieurs hypothèses. La comparaison des 3 génomes des espèces types terrestres témoigne d'une conservation importante des génomes en termes de taille, de synténie, de nombres de gènes codants et communs entre les 3 espèces. Les hybridations ADN/ADN (DDH) réalisées *in silico* indiquent des valeurs comprises entre 44 et 50% entre les espèces types du genre. L'analyse des génomes des trois souches isolées au cours de ce travail (*i.e.* *M. SLHTYRO*, *M. SLHTETIS* et *M. SLHKRYOS*) nous indique que la taille de leurs génomes est inférieure de 10% par rapport aux génomes des espèces types du genre. Une analyse comparée des génomes a démontré l'absence de gènes dans les génomes des nouveaux isolats. Ainsi les gènes codants pour la catalase, la peroxydase, le phytochrome sont absents dans certains génomes des souches isolées des DHABS et présents dans les génomes des souches types. Une des stratégies cellulaires utilisée par les populations microbiennes pour s'adapter aux contraintes environnementales imposées de leur biotope consiste à limiter les dépenses énergétiques et d'utiliser efficacement les substrats disponibles dans le milieu. Les microorganismes peuvent ainsi s'adapter aux conditions environnementales pour survivre aux conditions extrêmes de leur habitat. La réduction de la taille des génomes semble donc limiter la dépense énergétique liée par exemple à la réplication de l'ADN qui apparaît comme un processus énergétiquement très coûteux. Nous avons en outre observé que les gènes nécessaires à la synthèse du glycogène, qui est une molécule de réserve, étaient absents dans deux des souches issues des DHABS (*SLHKRYOS* et *SLHTETIS*). Tous ces résultats soulignent que les souches isolées de DHABS

en Mer Méditerranée dans le cadre de ce travail de thèse sont autochtones et adaptées à leur habitat. En effet, les caractéristiques physiologiques observées sont compatibles avec les conditions *in situ* simulées au laboratoire : milieu très réduit, absence de lumière, pression hydrostatique.

Les hybridations ADN/ADN (DDH) réalisées *in silico* nous indiquent que *M. SLHTYRO* et *M. SLHTHETIS* sont deux souches d'une nouvelle espèce que l'on propose de nommer *Methanohalophilus profundus*.

Les souches méthanogènes isolées dans ce travail de thèse appartiennent au genre *Methanohalophilus* et utilisent les composés méthylés comme substrat pour la méthanogénèse. Les amines méthylées (monométhylamine, diméthylamine et triméthylamine) sont de petits composés organiques azotés ubiquistes dans les milieux marins. L'origine majeure des amines méthylées vient de la dégradation d'une variété de précurseurs incluant la bétaine, la choline et le TMAO. La bétaine et le TMAO sont accumulés dans les cellules en réponse aux stress salés et hydriques. Ce sont également des substrats potentiels directs pour la méthanogénèse (par exemple dans le genre *Methanococcoides*). Pourtant l'utilisation de la bétaine, de la choline ou du N,N diméthylethanolamine n'a pas été révélée pour les isolats méthanogènes marins des DHABs. En conditions anaérobies, le TMA par exemple pourrait être produit à partir de la bétaine et impliquerait des bactéries fermentaires ou des sulfato-réductrices. D'autre part la choline peut être dégradée en TMA par des bactéries sulfato-réductrices. Ainsi la disponibilité en triméthylamine (TMA) dans le milieu doit donc être pourvue par un processus microbien. Le TMA a été détecté dans les bassins Tyro et Kryos par mesures en chromatographie ionique. L'ensemble des enrichissements que nous avons réalisé dans des milieux de culture additionnés de bétaine et de choline, montrait l'enrichissement de microorganismes affiliés à l'ordre des *Halanaerobiales* et plus précisément au genre *Halanaerobium*. Les membres de cet ordre et de ce genre sont capables de dégrader la bétaine, soluté compatible utilisé par un grand nombre de microorganismes pour lutter contre le stress osmotique et notamment les souches du genre *Methanohalophilus*. Nos approches culturales mettent en évidence les microorganismes cultivables appartenant aux genres *Marinobacter*, *Halanaerobium*, *Methanohalophilus* et des souches du genre *Halomonas*, famille des *Halomonadaceae*. La présence de fortes concentrations en choline (> 50 mM) mesurée dans le bassin Kryos et les communautés microbiennes cultivées nous permettent de proposer un modèle de fonctionnement qui pourrait

conduire à la production de méthane dans les DHABs. (Figure 70). La crise saline du Messinien a conduit à une crise écologique majeure puisque l'ensemble des espèces marines sont mortes suite à la dessiccation du bassin méditerranéen et se sont progressivement déposées dans les couches sédimentaires sous-jacentes au dépôt de sels. La choline est un constituant majeur des membranes cellulaires. Les poissons morts pourraient être aussi une source de TMAO, molécule qui leur permet de stabiliser leurs protéines. La réduction du TMAO par les microorganismes produit du TMA, c'est le cas particulier de souches appartenant aux genres *Halobacterium* et *Halococcus*,....

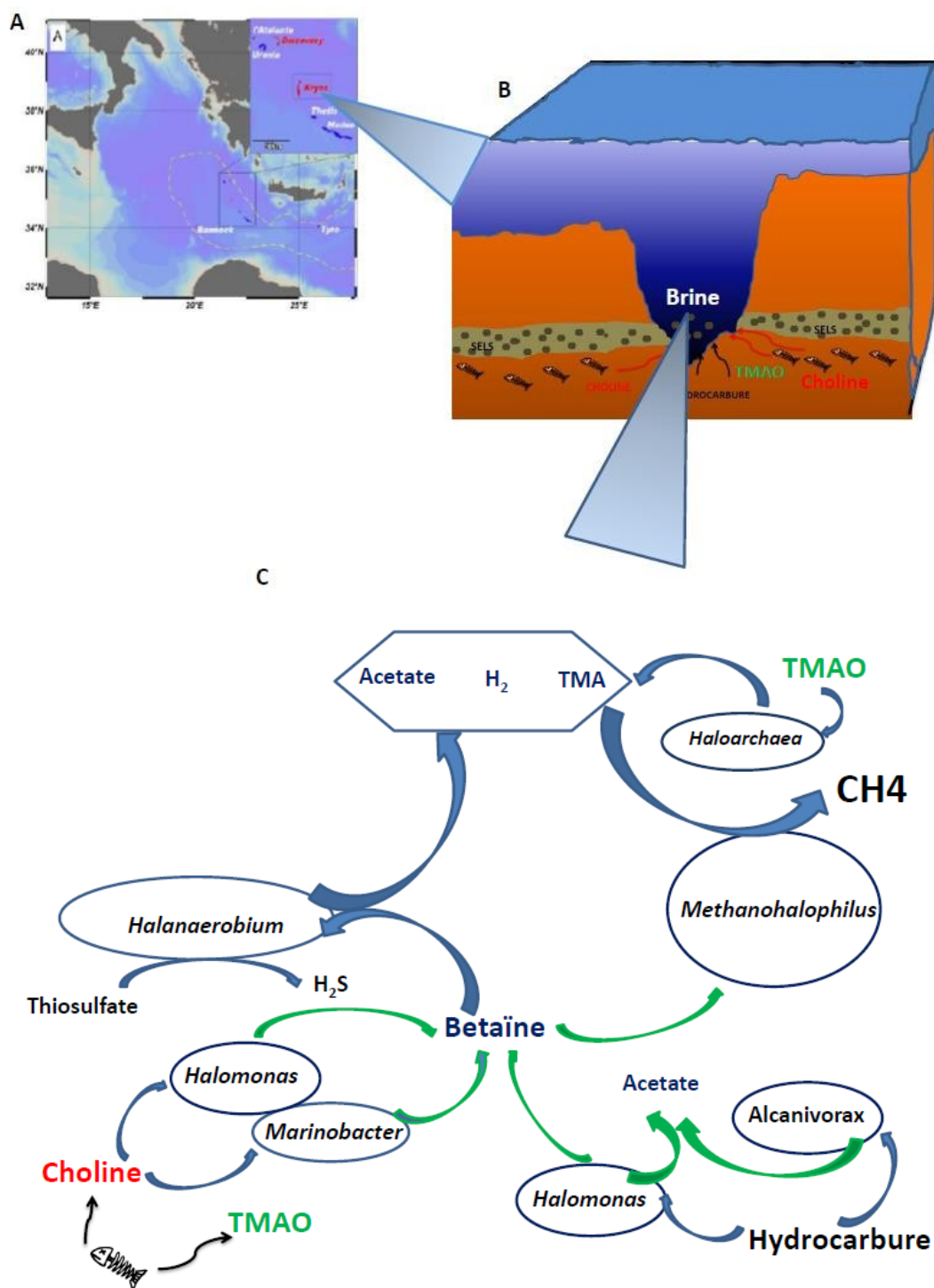


Figure 69: Schéma proposant le fonctionnement des DHABs. A : Localisation des DHABS en Mer Méditerranée. B : Schéma d'un bassin indiquant la présence des cristaux de sels et de la présence probable d'espèces marines mortes sous les croûtes de sels. La présence d'hydrocarbure dans les sédiments est également proposée. C : Représentation synthétique des processus métaboliques microbiens impliquant les microorganismes cultivés de ces bassins (ce travail) conduisant à la production de méthane biogénique. L'hypothèse de la bétaine comme précurseur principale des composés méthylés est proposée.

Les approches culturelles notamment les approches hauts-débits ont démontrées la présence de souches microbiennes cultivables appartenant à des genres fréquemment retrouvés dans les environnements salés et pollués par des hydrocarbures. C'est le cas par exemple des genres *Alcanivorax*, *Marinobacter* et *Halomonas*. A notre connaissance, la qualité et la quantité d'hydrocarbures présents dans les DHABs n'ont jamais été décrits en détail. Cependant la présence d'hydrocarbures est fort possible en raison du type de roches sédimentaires sous-jacentes associées aux bassins profonds anoxiques hypersalés. L'emploi de milieux de cultures variés et innovants incluant des hydrocarbures linéaires et aromatiques en conditions de fortes pressions hydrostatiques (aérobie et anaérobie) devraient permettre à l'avenir de mieux appréhender les fonctions et la diversité des microorganismes dans les DHABs.

Depuis la découverte du premier DHAB en 1983, les nombreuses équipes de recherche utilisant des approches culturelles n'ont jamais réussi à cultiver au laboratoire les représentants appartenant aux phylum associés aux DHABs et composés uniquement de séquences environnementales « d'incultivés ». Dans tous les cas, les milieux de culture devront tenter de mimer le plus fidèlement possible les conditions naturelles de l'habitat, pour permettre la croissance des populations indigènes. Ceci implique d'augmenter par exemple les températures d'incubation à 45°C et d'utiliser des conditions anaérobies en ajoutant différents substrats originaux (ex. : choline, hydrocarbure à chaîne linéaire ou aromatique). La gamme de température 40-45°C est la température optimale de croissance de la souche M27-SA2 *Halanaeroarchaeum sulfurireducens*, isolée du bassin Medee et de la souche *Natrinema salaciae* isolée elle aussi du bassin Medee et proches de séquences de clones d'ADNr 16S obtenues du bassin Thetis.

Les résultats obtenus relatifs aux expériences de stabilité des ARNs en conditions hypersalées à partir de la souche *M. SLHTYRO* nous indiquent que cette souche met en oeuvre des mécanismes qui assurent la stabilité de son matériel génétique lorsque la pression osmotique augmente fortement. Ces mécanismes d'adaptation expliqueraient pourquoi il est possible de cultiver au laboratoire des microorganismes halophiles « anciens » qui ont été piégés et probablement conservés dans des cristaux de sels pendant des milliers d'années.

Dans un contexte plus général de connaissances et afin d'étudier les variations du climat global et celles du niveau marin, les événements géologiques extrêmes comme le Messinien, les ressources naturelles, le stockage du CO₂, et la biosphère profonde, un projet de forage

extrêmement ambitieux, projet « GOLD » (Gulf of Lion's Drilling) dans le Golfe du Lion a été proposé dans le cadre du programme international IODP (International Ocean Drilling Program). L'étude de la biosphère souterraine est coordonnée par notre laboratoire. La possibilité de forer dans les sédiments et les croûtes de sels associées pourraient apporter des connaissances sur l'existence des communautés anciennes qui ont été piégées dans ces cristaux de sels lors de leur formation. Un second projet de forage dans le cadre du programme international IODP, DREAM (Deep-Sea Record of Mediterranean Messinian events), a été proposé pour réaliser des forages profonds le long d'un transect allant des Baléares jusqu'à la Sicile. Le forage profond des DHABs en Mer Méditerranée est crucial pour étudier les variations du climat, les variations du niveau marin, les événements géologiques extrêmes comme la crise saline du Messinien, l'existence de ressources énergétiques naturelles, les possibilités de stockage du CO₂, et l'existence d'une biosphère profonde.

La découverte de microorganismes vivants dans des conditions extrêmes caractéristiques des DHABs suscite des interrogations quant à leur origine : i) les lignées d'incultivées MSBL et en particulier les lignées MSBL1 et KB1 mises en évidence par les méthodes moléculaires dans les DHABs sont-elles retrouvées dans les différents cristaux de sels c'est-à-dire piégées depuis 6 millions d'années ? ii) la présence de ces communautés microbiennes endémiques des DHABs résultent-elles de la dissolution des cristaux de sels ? et iii) ces lignées sont-elles présentes dans les niches/habitats sous ou sus-jacente aux dépôts salifères ?

Bibliographie

- AUCH AF, HENZ SR, GOKER M: Phylogenies from whole genomes: Methodological update within a distance-based framework. German conference on Bioinformatics, Tübingen 2006.
- AUCH AF: A phylogenetic potpourri - Computational methods for analysing genome-scale data. PhD thesis. Universität Tübingen, Wilhelmstr. 32, 72074 Tübingen 2009, Universität Tübingen, Wilhelmstr. 32, 72074 Tübingen 2009, [].
- ACHTMAN, M. & WAGNER, M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Micro*, 6, 431-440.
- AL-WAHAIB, D., AL-BADER, D., ABDOL, D., ELIYAS, M. & RADWAN, S. S. 2016. Consistent Occurrence of Hydrocarbonoclastic Marinobacter Strains in Various Cultures of Picocyanobacteria from the Arabian Gulf: Promising Associations for Biodegradation of Marine Oil Pollution. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 26, 261-268.
- ALAIN, K. & QUERELLOU, J. 2009. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 13, 583-594.
- ALBUQUERQUE, L., TABORDA, M., LA CONO, V., YAKIMOV, M. & DA COSTA, M. S. 2012. *Natrinema salaciae* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from the deep, hypersaline anoxic Lake Medee in the Eastern Mediterranean Sea. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 368-373.
- ALOISI, G., DREWS, M., WALLMANN, K. & BOHRMANN, G. 2004. Fluid expulsion from the Dvurechenskii mud volcano (Black Sea): Part I. Fluid sources and relevance to Li, B, Sr, I and dissolved inorganic nitrogen cycles. *Earth and Planetary Science Letters*, 225, 347-363.
- ANAN'INA, L. N., PLOTNIKOVA, E. G., GAVRISH, E., DEMA KOV, V. A. & EVTUSHENKO, L. I. 2007. *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a naphthalene-utilizing microbial association]. *Mikrobiologiya*, 76, 369-76.
- ANTON, J., OREN, A., BENLLOCH, S., RODRIGUEZ-VALERA, F., AMANN, R. & ROSSELLO-MORA, R. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 485-491.
- ARAHAL, D. R., GUTIERREZ, M. C., VOLCANI, B. E. & VENTOSA, A. 2000. Taxonomic analysis of extremely halophilic archaea isolated from 56-years-old Dead Sea brine samples. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 376-385.
- AZIZ, R. K., BARTELS, D., BEST, A. A., DEJONGH, M., DISZ, T., EDWARDS, R. A., FORMSMA, K., GERDES, S., GLASS, E. M., KUBAL, M., MEYER, F., OLSEN, G., OLSON, R., OSTERMAN, A., OVERBEEK, R., MCNEIL, L., PAARMANN, D., PACZIAN, T., PARRELLO, B., PUSCH, G., REICH,

- C., STEVENS, R., VASSIEVA, O., VONSTEIN, V., WILKE, A. & ZAGNITKO, O. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9.
- BAKER, B. J., LESNIEWSKI, R. A. & DICK, G. J. 2012. Genome-enabled transcriptomics reveals archaeal populations that drive nitrification in a deep-sea hydrothermal plume. *Isme Journal*, 6, 2269-2279.
- BAPTESTE, E. & WALSH, D. A. 2005. Does the 'Ring of Life' ring true? *Trends in Microbiology*, 13, 256-261.
- BEJA, O., ARAVIND, L., KOONIN, E. V., SUZUKI, M. T., HADD, A., NGUYEN, L. P., JOVANOVICH, S., GATES, C. M., FELDMAN, R. A., SPUDICH, J. L., SPUDICH, E. N. & DELONG, E. F. 2000. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 289, 1902-1906.
- BERG, I. A. 2011. Ecological Aspects of the Distribution of Different Autotrophic CO₂ Fixation Pathways. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1925-1936.
- BERG, I. A., KOCKELKORN, D., RAMOS-VERA, W. H., SAY, R. F., ZARZYCKI, J., HÄGLER, M., ALBER, B. E. & FUCHS, G. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat Rev Micro*, 8, 447-460.
- BLAINEY, P. C. 2013. *The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea*.
- BOETZER, M., HENKEL, C. V., JANSEN, H. J., BUTLER, D. & PIROVANO, W. 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*, 27, 578-579.
- BOETZER, M. & PIROVANO, W. 2014. SSPACE-LongRead: scaffolding bacterial draft genomes using long read sequence information. *Bmc Bioinformatics*, 15.
- BOONE, D. R., MATHRANI, I. M., LIU, Y. T., MENAIA, J., MAH, R. A. & BOONE, J. E. 1993. Isolation and characterization of *Methanohalophilus portucalenis* sp.nov., and DNA reassociation study of the genus *Methanohalophilus* (VOL 43, PG 431, 1993). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 867-867.
- BORREL, G., ADAM, P. S. & GRIBALDO, S. 2016. Methanogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association. *Genome Biology and Evolution*.
- BORREL, G., O'TOOLE, P. W., HARRIS, H. M., PEYRET, P., BRUGÈRE, J.-F. & GRIBALDO, S. 2013. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol Evol*, 5.
- BOWMAN, J. P. & MCMEEKIN, T. A. 2015. *Alteromonadales* ord. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd.
- BRETTIN, T., DAVIS, J. J., DISZ, T., EDWARDS, R. A., GERDES, S., OLSEN, G. J., OLSON, R., OVERBEEK, R., PARRELLO, B., PUSCH, G. D., SHUKLA, M., THOMASON, J. A., STEVENS, R., VONSTEIN, V., WATTAM, A. R. & XIA, F. F. 2015. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5.

- BRITO-ECHEVERRIA, J., LOPEZ-LOPEZ, A., YARZA, P., ANTON, J. & ROSSELLO-MORA, R. 2009. Occurrence of *Halococcus* spp. in the nostrils salt glands of the seabird *Calonectris diomedea*. *Extremophiles*, 13, 557-565.
- BROOKS, J. M., BRIGHT, T. J., BERNARD, B. B. & SCHWAB, C. R. 1979. Chemical aspects of a brine pool at the East flower garden bank, Northwestern Gulf of Mexico. *Limnology and Oceanography*, 24, 735-745.
- BRUGÈRE, J. F., BORREL, G., GACI, N., TOTTEY, W., O'TOOLE, P. W. & MALPUECH-BRUGÈRE, C. 2014. Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes*, 5.
- BRUSA, T., BORIN, S., FERRARI, F., SORLINI, C., CORSELLI, C. & DAFFONCHIO, D. 2001. Aromatic hydrocarbon degradation patterns and catechol 2,3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the eastern Mediterranean sea. *Microbiological Research*, 156, 49-58.
- BRUSA, T., DELPUPPO, E., FERRARI, A., RODONDI, G., ANDREIS, C. & PELLEGRINI, S. 1997. Microbes in deep-sea anoxic basins. *Microbiological Research*, 152, 45-56.
- BURNS, D. G., JANSSEN, P. H., ITOH, T., KAMEKURA, M., LI, Z., JENSEN, G., RODRIGUEZ-VALERA, F., BOLHUIS, H. & DYALL-SMITH, M. L. 2007. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 387-392.
- CARINI, P., STEINDLER, L., BESZTERI, S. & GIOVANNONI, S. J. 2013. Nutrient requirements for growth of the extreme oligotroph '*Candidatus Pelagibacter ubique*' HTCC1062 on a defined medium. *ISME J*, 7, 592-602.
- CAVALIER-SMITH, T. 2002. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 7-76.
- CHARBONNIER F, FORTERRE P. 1995. Purification of plasmids from thermophilic and hyperthermophilic archaea, p 87–90. In Robb FT, Place AR (ed), *Archaea: a laboratory manual—thermophiles*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- CHARLOU, J. L., DONVAL, J. P., ZITTER, T., ROY, N., JEAN-BAPTISTE, P., FOUCHER, J. P. & WOODSIDE, J. 2003. Evidence of methane venting and geochemistry of brines on mud volcanoes of the eastern Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 50, 941-958.
- CITA, M. B. 2006. Exhumation of Messinian evaporites in the deep-sea and creation of deep anoxic brine-filled collapsed basins. *Sedimentary Geology*, 188-189, 357-378.

- COLSTON, S. M., FULLMER, M. S., BEKA, L., LAMY, B., GOGARTEN, J. P. & GRAF, J. 2014. Bioinformatic Genome Comparisons for Taxonomic and Phylogenetic Assignments Using *Aeromonas* as a Test Case. *Mbio*, 5.
- CONO, V. L., ARCADI, E., SPADA, G. L., BARRECA, D., LAGANA, G., BELLOCCO, E., CATALFAMO, M., SMEDILE, F., MESSINA, E., GIULIANO, L. & YAKIMOV, M. M. 2015. A Three-Component Microbial Consortium from Deep-Sea Salt-Saturated Anoxic Lake Thetis Links Anaerobic Glycine Betaine Degradation with Methanogenesis. *Microorganisms*, 3, 500-17.
- CONRAD, P. G. & NEALSON, K. H. 2001. A Non-Earthcentric Approach to Life Detection. *Astrobiology*, 1, 15-24.
- CYTRYN, E., MINZ, D., OREMLAND, R. S. & COHEN, Y. 2000. Distribution and diversity of archaea corresponding to the limnological cycle of a hypersaline stratified lake (Solar lake, Sinai, Egypt). *Appl Environ Microbiol*, 66, 3269-76.
- DAFFONCHIO, D., BORIN, S., BRUSA, T., BRUSETTI, L., VAN DER WIELEN, P., BOLHUIS, H., YAKIMOV, M. M., D'AURIA, G., GIULIANO, L., MARTY, D., TAMBURINI, C., MCGENITY, T. J., HALLSWORTH, J. E., SASS, A. M., TIMMIS, K. N., TSELEPIDES, A., DE LANGE, G. J., HUBNER, A., THOMSON, J., VARNAVAS, S. P., GASPARONI, F., GERBER, H. W., MALINVERNO, E., CORSELLI, C., GARCIN, J., MCKEW, B., GOLYSHIN, P. N., LAMPADARIOU, N., POLYMENAKOU, P., CALORE, D., CENEDESE, S., ZANON, F., HOOG, S. & BIODEEP SCI, P. 2006. Stratified prokaryote network in the oxic-anoxic transition of a deep-sea halocline. *Nature*, 440, 203-207.
- DALY, R. A., BORTON, M. A., WILKINS, M. J., HOYT, D. W., KOUNTZ, D. J., WOLFE, R. A., WELCH, S. A., MARCUS, D. N., TREXLER, R. V., MACRAE, J. D., KRZYCKI, J. A., COLE, D. R., MOUSER, P. J. & WRIGHTON, K. C. 2016. Microbial metabolisms in a 2.5-km-deep ecosystem created by hydraulic fracturing in shales. *Nature Microbiology*, 1.
- DELEY, J., CATTOIR, H. & REYNAERT, A. 1970. Quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry*, 12, 133-8.
- DENARO, R., CRISAFI, F., RUSSO, D., GENOVESE, M., MESSINA, E., GENOVESE, L., CARBONE, M., CIAVATTA, M. L., FERRER, M., GOLYSHIN, P. & YAKIMOV, M. M. 2014. *Alcanivorax borkumensis* produces an extracellular siderophore in iron-limitation condition maintaining the hydrocarbon-degradation efficiency. *Marine Genomics*, 17, 43-52.
- DENNER, E. B. M., MCGENITY, T. J., BUSSE, H. J., GRANT, W. D., WANNER, G. & STANLOTTER, H. 1994. *HALOCOCCUS SALIFODINAE* sp.nov., an archaeal isolate from an Australian salt mine. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 774-780.

- DEUTCH, C. E. 1994. CHARACTERIZATION OF A NOVEL SALT-TOLERANT BACILLUS SP FROM THE NASAL CAVITIES OF DESERT IGUANAS. *FEMS Microbiology Letters*, 121, 55-60.
- DOMBROWSKI, H. 1963. BACTERIA FROM PALEOZOIC SALT DEPOSITS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 108, 453-460.
- DONNELLY, M. I. & DAGLEY, S. 1980. PRODUCTION OF METHANOL FROM AROMATIC-ACIDS BY PSEUDOMONAS-PUTIDA. *Journal of Bacteriology*, 142, 916-924.
- DRIDI, B., FARDEAU, M. L., OLLIVIER, B., RAOULT, D. & DRANCOURT, M. 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62.
- EDER, W., JAHNKE, L. L., SCHMIDT, M. & HUBER, R. 2001. Microbial diversity of the brine-seawater interface of the Kebrit Deep, Red Sea, studied via 16S rRNA gene sequences and cultivation methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3077-3085.
- EDER, W., LUDWIG, W. & HUBER, R. 1999. Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea. *Archives of Microbiology*, 172, 213-218.
- EDER, W., SCHMIDT, M., KOCH, M., GARBE-SCHÖNBERG, D. & HUBER, R. 2002. Prokaryotic phylogenetic diversity and corresponding geochemical data of the brine-seawater interface of the Shaban Deep, Red Sea. *Environmental Microbiology*, 4, 758-763.
- ERBA, E. 1991. DEEP MID-WATER BACTERIAL MATS FROM ANOXIC BASINS OF THE EASTERN MEDITERRANEAN. *Marine Geology*, 100, 83-101.
- ERBA, E., RODONDI, G., PARISI, E., TEN HAVEN, H. L., NIP, M. & DE LEEUW, J. W. 1987. Gelatinous pellicles in deep anoxic hypersaline basins from the Eastern Mediterranean. *Marine Geology*, 75, 165-183.
- FOX, G. E., MAGRUM, L. J., BALCH, W. E., WOLFE, R. S. & WOESE, C. R. 1977. CLASSIFICATION OF METHANOGENIC BACTERIA BY 16S RIBOSOMAL-RNA CHARACTERIZATION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 4537-4541.
- GABOYER, F., VANDENABEELE-TRAMBOUZE, O., CAO, J. W., CIOBANU, M. C., JEBBAR, M., LE ROMANCER, M. & ALAIN, K. 2014. Physiological features of *Halomonas lionensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a Mediterranean Sea sediment. *Research in Microbiology*, 165, 490-500.
- GALARDINI, M., BIONDI, E. G., BAZZICALUPO, M. & MENGONI, A. 2011. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. *Source Code for Biology and Medicine*, 6, 11.
- GARCIA, J. L., PATEL, B. K. C. & OLLIVIER, B. 2000. Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6, 205-226.

- GARRITY, G. M., BELL, J. A. & LILBURN, T. 2015. Oceanospirillales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd.
- GAWAD, C., KOH, W. & QUAKE, S. R. 2016. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature Reviews Genetics*, 17, 175-188.
- GIBBS, A. J. & MCINTYRE, G. A. 1970. DIAGRAM, A METHOD FOR COMPARING SEQUENCES - ITS USE WITH AMINO ACID AND NUCLEOTIDE SEQUENCES. *European Journal of Biochemistry*, 16, 1-&.
- GIOVANNONI, S. J., BRITSCHGI, T. B., MOYER, C. L. & FIELD, K. G. 1990. GENETIC DIVERSITY IN SARGASSO SEA BACTERIOPLANKTON. *Nature*, 345, 60-63.
- GIOVANNONI, S. J., TRIPP, H. J., GIVAN, S., PODAR, M., VERGIN, K. L., BAPTISTA, D., BIBBS, L., EADS, J., RICHARDSON, T. H., NOORDEWIER, M., RAPPÉ, M. S., SHORT, J. M., CARRINGTON, J. C. & MATHUR, E. J. 2005. Genome Streamlining in a Cosmopolitan Oceanic Bacterium. *Science*, 309, 1242-1245.
- GOODWIN, S., MCPHERSON, J. D. & MCCOMBIE, W. R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17, 333-351.
- GORIS, J., KONSTANTINIDIS, K., KLAPPENBACH, J., COENYE, T., VANDAMME, P. & TIEDJE, J. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57.
- GRADY, M. M. 2006. WatSen: searching for clues for water (and life) on Mars. *International Journal of Astrobiology*, 5, 211-219.
- GRANT, W. D., GEMMELL, R. T. & MCGENITY, T. J. 1998. Halobacteria: the evidence for longevity. *Extremophiles*, 2, 279-287.
- GRAUR, D. & PUPKO, T. 2001. The permian bacterium that isn't. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 1143-1146.
- GREELEY, R. & FAGENTS, S. A. 2001. Icelandic pseudocraters as analogs to some volcanic cones on Mars. *Journal of Geophysical Research-Planets*, 106, 20527-20546.
- GRIBALDO, S. & BROCHIER-ARMANET, C. 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 361, 1007-1022.
- HALES, B. A., EDWARDS, C., RITCHIE, D. A., HALL, G., PICKUP, R. W. & SAUNDERS, J. R. 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog feat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 668-675.
- HALLSWORTH, J. E., YAKIMOV, M. M., GOLYSHIN, P. N., GILLION, J. L. M., D'AURIA, G., ALVES, F. D. L., LA CONO, V., GENOVESE, M., MCKEW, B. A., HAYES, S. L., HARRIS, G., GIULIANO, L.,

- TIMMIS, K. N. & MCGENITY, T. J. 2007a. Limits of life in MgCl₂-containing environments: chaotropy defines the window. *Environmental Microbiology*, 9, 801-813.
- HAYWARD, H. R. & STADTMAN, T. C. 1959. ANAEROBIC DEGRADATION OF CHOLINE .1. FERMENTATION OF CHOLINE BY AN ANAEROBIC, CYTOCHROME-PRODUCING BACTERIUM, *VIBRIO-CHOLINICUS* N SP. *Journal of Bacteriology*, 78, 557-561.
- HEBSGAARD, M. B., PHILLIPS, M. J. & WILLERSLEV, E. 2005. Geologically ancient DNA: fact or artefact? *Trends in Microbiology*, 13, 212-220.
- HEDDERICH, R. & WHITMAN, W. B. 2006. Physiology and biochemistry of the methane-producing Archaea. *The prokaryotes*. New York: Springer.
- HENNEKE, E., LUTHER III, G. W., DE LANGE, G. J. & HOEFS, J. 1997. Sulphur speciation in anoxic hypersaline sediments from the eastern Mediterranean Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 307-321.
- HERSEY, J. B. 1965. SEDIMENT PONDING IN DEEP SEA. *Geological Society of America Bulletin*, 76, 1251-&.
- HOLMES, R. M., AMINOT, A., KEROUEL, R., HOOKER, B. A. & PETERSON, B. J. 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 1801-1808.
- HORVATH, P. & BARRANGOU, R. 2010. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*, 327, 167-170.
- HSU, K. J., RYAN, W. B. F. & CITA, M. B. 1973. LATE MIOCENE DESICCATION OF MEDITERRANEAN. *Nature*, 242, 240-244.
- HUSS, V. A. R., FESTL, H. & SCHLEIFER, K. H. 1983. STUDIES ON THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF DNA HYBRIDIZATION FROM RENATURATION RATES. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 184-192.
- IINO, T., TAMAKI, H., TAMAZAWA, S., UENO, Y., OHKUMA, M., SUZUKI, K., IGARASHI, Y. & HARUTA, S. 2013. Candidatus *Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class Thermoplasmata. *Microbes Environ/JSME*, 28.
- JEBBAR, M., FRANZETTI, B., GIRARD, E. & OGER, P. 2015. Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles*, 19, 721-740.
- JEBBAR, M., VANNIER, P., MICHOD, G., MARTEINSSON, V.T. 2016. Exploring the diversity of the deep sea. in LJ Stal & MS Cretoiu (eds), *The Marine Microbiome: An Untapped Source of Biodiversity and Biotechnological Potential*. Springer International Publishing, pp. 227-249.

- JIANG, H., DONG, H., ZHANG, G., YU, B., CHAPMAN, L. R. & FIELDS, M. W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3832-45.
- JOHNSON, L. S., EDDY, S. & PORTUGALY, E. 2010. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC Bioinform*, 11.
- JONES, W. J., LEIGH, J. A., MAYER, F., WOESE, C. R. & WOLFE, R. S. 1983. *Methanococcus jannaschii* sp.nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, 136, 254-261.
- JONGSMA, D., FORTUIN, A. R., HUSON, W., TROELSTRA, S. R., KLAVER, G. T., PETERS, J. M., VANHARTEN, D., DELANGE, G. J. & TENHAVEN, L. 1983. Discovery of an anoxic basin within the strabo trench, eastern mediterranean. *Nature*, 305, 795-797.
- JOYE, S. B., MACDONALD, I. R., MONTOYA, J. P. & PECCINI, M. 2005. Geophysical and geochemical signatures of Gulf of Mexico seafloor brines. *Biogeosciences*, 2, 295-309.
- JOYE, S. B., SAMARKIN, V. A., ORCUTT, B. N., MACDONALD, I. R., HINRICHS, K. U., ELVERT, M., TESKE, A. P., LLOYD, K. G., LEVER, M. A., MONTOYA, J. P. & MEILE, C. D. 2009. Metabolic variability in seafloor brines revealed by carbon and sulphur dynamics. *Nature Geoscience*, 2, 349-354.
- KAPPES, R. M., KEMPF, B. & BREMER, E. 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: Characterization of OpuD. *Journal of Bacteriology*, 178, 5071-5079.
- KARGEL, J. S., KAYE, J. Z., HEAD, J. W., MARION, G. M., SASSEN, R., CROWLEY, J. K., PRIETO BALLESTEROS, O., GRANT, S. A. & HOGENBOOM, D. L. 2000. Europa's crust and ocean: Origin, composition, and the prospects for life. *Icarus*, 148, 226-265.
- KAster, A.-K., MOLL, J., PAREY, K. & THAUER, R. K. 2011. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108.
- KATAYAMA, T., YOSHIOKA, H., MOCHIMARU, H., MENG, X. Y., MURAMOTO, Y., USAMI, J., IKEDA, H., KAMAGATA, Y. & SAKATA, S. 2014. *Methanohalophilus levihalophilus* sp nov., a slightly halophilic, methylotrophic methanogen isolated from natural gas-bearing deep aquifers, and emended description of the genus *Methanohalophilus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2089-2093.
- KENDALL, M. M., LIU, Y., SIEPRAWKA-LUPA, M., STETTER, K. O., WHITMAN, W. B. & BOONE, D. R. 2006. *Methanococcus aeolicus* sp. nov., a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and

- deep marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1525-1529.
- KMINEK, G., BADA, J. L., POGLIANO, K. & WARD, J. F. 2003. Radiation-dependent limit for the viability of bacterial spores in halite fluid inclusions and on Mars. *Radiation Research*, 159, 722-729.
- KNAUTH, L. P. & BURT, D. M. 2002. Eutectic brines on Mars: Origin and possible relation to young seepage features. *Icarus*, 158, 267-271.
- KONSTANTINIDIS, K. T. & TIEDJE, J. M. 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2567-2572.
- KOPF, A., BICAK, M., KOTTMANN, R., SCHNETZER, J., KOSTADINOV, I., LEHMANN, K., FERNANDEZ-GUERRA, A., JEANTHON, C., RAHAV, E., ULLRICH, M., WICHELS, A., GERDTS, G., POLYMENAKOU, P., KOTOULAS, G., SIAM, R., ABDALLAH, R., SONNENSCHN, E., CARIU, T., O'GARA, F., JACKSON, S., ORLIC, S., STEINKE, M., BUSCH, J., DUARTE, B., CACADOR, I., CANNING-CLODE, J., BOBROVA, O., MARTEINSSON, V., REYNISSE, E. & LOUREIRO, C. 2015. The ocean sampling day consortium. *GigaScience*, 4, 27.
- KOPKE, B., WILMS, R., ENGELN, B., CYPIONKA, H. & SASS, H. 2005. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7819-7830.
- KOZLOWSKI, J. A., STIEGLMEIER, M., SCHLEPER, C., KLOTZ, M. G. & STEIN, L. Y. 2016. Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and Thaumarchaeota. *Isme Journal*, 10, 1836-1845.
- KRONINGER, L., BERGER, S., WELTE, C. & DEPPENMEIER, U. 2016. Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *Febs Journal*, 283, 472-483.
- L'HARIDON, S., CHALOPIN, M., COLOMBO, D. & TOFFIN, L. 2014. *Methanococcoides vulcani* sp nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and N,N-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococcoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1978-1983.
- L'HARIDON, S., MARKX, G., INGHAM, C.J., PATERSON, L., DUTHOIT, F. & Le BLAY, G. 2016. New Approaches for Bringing the Uncultured into Culture. in LJ Stal & MS Cretoiu (eds), *The Marine Microbiome: An Untapped Source of Biodiversity and Biotechnological Potential*. Springer International Publishing, pp. 401-434.

- LA CONO, V., SMEDILE, F., BORTOLUZZI, G., ARCADI, E., MAIMONE, G., MESSINA, E., BORGHINI, M., OLIVERI, E., MAZZOLA, S., L'HARIDON, S., TOFFIN, L., GENOVESE, L., FERRER, M., GIULIANO, L., GOLYSHIN, P. N. & YAKIMOV, M. M. 2011. Unveiling microbial life in new deep-sea hypersaline Lake Thetis. Part I: Prokaryotes and environmental settings. *Environmental Microbiology*, 13, 2250-2268.
- LAI, M. C., HONG, T. Y. & GUNSALUS, R. P. 2000. Glycine betaine transport in the obligate halophilic archaeon *Methanohalophilus portucalensis*. *J Bacteriol*, 182.
- LANG, K., SCHULDES, J., KLINGL, A., POEHLEIN, A., DANIEL, R. & BRUNE, A. 2015. New Mode of Energy Metabolism in the Seventh Order of Methanogens as Revealed by Comparative Genome Analysis of "Candidatus *Methanoplasma termitum*". *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1338-1352.
- LEE, J. C., KIM, S. J. & WHANG, K. S. 2016. *Halomonas sediminicola* sp nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 3865-3872.
- LEE, J. C., KIM, Y. S., YUN, B. S. & WHANG, K. S. 2015. *Idiomarina halophila* sp nov., isolated from a solar saltern sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1268-1273.
- LIPUS, D., VIKRAM, A., ROSS, D. E. & BIBBY, K. 2016. Draft Genome Sequence of *Methanohalophilus mahii* Strain DAL1 Reconstructed from a Hydraulic Fracturing-Produced Water Metagenome. *Genome announcements*, 4.
- LITCHFIELD, C. D. 1998. Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics & Planetary Science*, 33, 813-819.
- LIU, Y. & WHITMAN, W. B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci*, 019.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A., RICHTER, M., PEÑA, A., TAMAMES, J. & ROSSELLÓ-MÓRA, R. 2013. New insights into the archaeal diversity of a hypersaline microbial mat obtained by a metagenomic approach. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 205-214.
- LUTON, P. E., WAYNE, J. M., SHARP, R. J. & RILEY, P. W. 2002. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology-Sgm*, 148, 3521-3530.
- LYU, Z. & LU, Y. H. 2015. Comparative genomics of three Methanocellales strains reveal novel taxonomic and metabolic features. *Environmental Microbiology Reports*, 7, 526-537.

- MALINVERNO, E., GASPARONI, F., GERBER, H. W. & CORSELLI, C. 2006. The exploration of Eastern Mediterranean deep hypersaline anoxic basins with MODUS: a significant example of technology spin-off from the GEOSTAR program. *Annals of Geophysics*, 49, 729-737.
- MANCINELLI, R. L. & KLOVSTAD, M. 2000. Martian soil and UV radiation: microbial viability assessment on spacecraft surfaces. *Planetary and Space Science*, 48, 1093-1097.
- MARCY, Y., OUVENEY, C., BIK, E. M., LÖSEKANN, T., IVANOVA, N., MARTIN, H. G., SZETO, E., PLATT, D., HUGENHOLTZ, P., RELMAN, D. A. & QUAKE, S. R. 2007. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 11889-11894.
- MARION, G. M., FRITSEN, C. H., EICKEN, H. & PAYNE, M. C. 2003. The search for life on Europa: Limiting environmental factors, potential habitats, and Earth analogues. *Astrobiology*, 3, 785-811.
- MARTENS-HABBENA, W. & SASS, H. 2006. Sensitive determination of microbial growth by nucleic acid staining in aqueous suspension. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 87-95.
- MATHRANI, I. M. & BOONE, D. R. 1985. Isolation and characterization of a moderately halophilic methanogen from a solar saltern. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 140-143.
- MATHRANI, I. M., BOONE, D. R., MAH, R. A., FOX, G. E. & LAU, P. P. 1988. *Methanohalophilus zhilinae* sp.nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 139-142.
- MEDINI, D., DONATI, C., TETTELIN, H., MASIGNANI, V. & RAPPUOLI, R. 2005. The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15, 589-594.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P., AUCH, A. F., KLENK, H. P. & GÖKER, M. 2013. GBDP on the grid: a genome-based approach for species delimitation adjusted for an automated and highly parallel processing of large data sets. *Hochleistungsrechnen in Baden-Württemberg - Ausgewählte Aktivitäten im bwGRiD 2012*. Karlsruhe: KIT Scientific Publishing.
- MEYER, F., PAARMANN, D., D'SOUZA, M., OLSON, R., GLASS, E. M., KUBAL, M., PACZIAN, T., RODRIGUEZ, A., STEVENS, R., WILKE, A., WILKENING, J. & EDWARDS, R. A. 2008. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *Bmc Bioinformatics*, 9.
- MILLER, J. F., SHAH, N. N., NELSON, C. M., LUDLOW, J. M. & CLARK, D. S. 1988. Pressure and temperature effects on growth and methane production of the extreme thermophile *Methanococcus jannaschii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 3039-3042.
- MILLER, T. L. & WOLIN, M. J. 1983. Oxidation of hydrogen and reduction of methanol to methane is the sole energy-source for a methanogen isolated from human feces. *Journal of Bacteriology*, 153, 1051-1055.

- MONGODIN, E. F., NELSON, K. E., DAUGHERTY, S., DEBOY, R. T., WISTER, J., KHOURI, H., WEIDMAN, J., WALSH, D. A., PAPKE, R. T., PEREZ, G. S., SHARMA, A. K., NESBO, C. L., MACLEOD, D., BAPTESTE, E., DOOLITTLE, W. F., CHARLEBOIS, R. L., LEGAULT, B. & RODRIGUEZ-VALERA, F. 2005. The genome of *Salinibacter ruber*: Convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 18147-18152.
- MOUNE, S., MANAC'H, N., HIRSCHLER, A., CAUMETTE, P., WILLISON, J. C. & MATHERON, R. 1999. *Haloanaerobacter salinarius* sp. nov., a novel halophilic fermentative bacterium that reduces glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen or serine as electron donors; emendation of the genus *Haloanaerobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 103-112.
- MOUNIER, J., CAMUS, A., MITTEAU, I., VAYSSE, P. J., GOULAS, P., GRIMAUD, R. & SIVADON, P. 2014. The marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 degrades a wide range of lipids and hydrocarbons through the formation of oleolytic biofilms with distinct gene expression profiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 90, 816-831.
- MULLER, V. & OREN, A. 2003. Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles*, 7, 261-266.
- MWIRICHIA, R., ALAM, I., RASHID, M., VINU, M., BA-ALAWI, W., ANTHONY KAMAU, A., KAMANDA NGUGI, D., GÖKER, M., KLENK, H.-P., BAJIC, V. & STINGL, U. 2016. Metabolic traits of an uncultured archaeal lineage -MSBL1- from brine pools of the Red Sea. *Scientific Reports*, 6, 19181.
- NIGRO, L. M., HYDE, A. S., MACGREGOR, B. J. & TESKE, A. 2016. Phylogeography, Salinity Adaptations and Metabolic Potential of the Candidate Division KB1 Bacteria Based on a Partial Single Cell Genome. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- NORTON, C. F. & GRANT, W. D. 1988. Survival of Halobacteria within fluid inclusions in salt crystals. *Journal of General Microbiology*, 134, 1365-1373.
- NORTON, C. F., MCGENITY, T. J. & GRANT, W. D. 1993. Archaeal Halophiles (Halobacteria) from 2 british salt mines. *Journal of General Microbiology*, 139, 1077-1081.
- NURK, S., BANKEVICH, A., ANTIPOV, D., GUREVICH, A., KOROBAYNIKOV, A., LAPIDUS, A., PRJIBELSKY, A., PYSHKIN, A., SIROTKIN, A., SIROTKIN, Y., STEPANAUSKAS, R., MCLEAN, J., LASKEN, R., CLINGENPEEL, S. R., WOYKE, T., TESLER, G., ALEKSEYEV, M. A. & PEVZNER, P. A. 2013. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. In: DENG, M., JIANG, R., SUN, F. & ZHANG, X. (eds.) *Research in Computational Molecular Biology: 17th Annual International Conference, RECOMB 2013, Beijing, China, April 7-10, 2013. Proceedings*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- OLLIVIER, B., FARDEAU, M. L., CAYOL, J. L., MAGOT, M., PATEL, B. K. C., PRENSIER, G. & GARCIA, J. L. 1998. *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 821-828.
- OLSEN, G. J., LANE, D. J., GIOVANNONI, S. J., PACE, N. R. & STAHL, D. A. 1986. Microbial ecology and evolution. A Ribosomal-RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, 40, 337-365.
- OREMLAND, R. S., KIENE, R. P., MATHRANI, I., WHITICAR, M. J. & BOONE, D. R. 1989. Description of an estuarine methylotrophic methanogen which grows on dimethyl sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 994-1002.
- OREMLAND, R. S., MARSH, L. & DESMARAIS, D. J. 1982. Methanogens in big soda lakes, Nevada- an alkaline, moderately hyeprsaline desert lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 462-468.
- OREN, A. 1999. Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 334-348.
- OREN, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 56-63.
- OREN, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4, 1746-1448.
- OVERBEEK, R., OLSON, R., PUSCH, G. D., OLSEN, G. J., DAVIS, J. J., DISZ, T., EDWARDS, R. A., GERDES, S., PARRELLO, B., SHUKLA, M., VONSTEIN, V., WATTAM, A. R., XIA, F. F. & STEVENS, R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42, D206-D214.
- PARISI, E., ERBA, E. & CITA, M. B. 1987. Stratigraphy and sedimentation in the anoxic Bannock basin (Eastern Mediterranean). *Marine Geology*, 75, 93-117.
- PARNELL, J., BARON, M. & LINDGREN, P. 2006a. Potential for irradiation of methane to form complex organic molecules in impact craters: Implications for Mars, Titan and Europa. *Journal of Geochemical Exploration*, 89, 322-325.
- PARNELL, J., BARON, M. & WYCHERLEY, H. 2006b. *The potential for survival of organic matter in fluid inclusions at impact sites*.
- PATEREK, J. R. & SMITH, P. H. 1988. *Methanohalophilus mahii* gen-nov, sp-nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 122-123.
- PERRON, J. T., MITROVICA, J. X., MANGA, M., MATSUYAMA, I. & RICHARDS, M. A. 2007. Evidence for an ancient martian ocean in the topography of deformed shorelines. *Nature*, 447, 840-843.
- PIRONON, J., PAGEL, M., LEVEQUE, M. H. & MOGE, M. 1995. Organic inclusions in salt. Solid and liquid organic matter, carbon- dioxide and nitrogen species in fluid inclusions from the Bresse basin (FRANCE). *Organic Geochemistry*, 23, 391-402.

- POLYMENAKOU, P. N., STEPHANOU, E. G., TSELEPIDES, A. & BERTILSSON, S. 2007. Organic matter preservation and microbial community accumulations in deep-hypersaline anoxic basins. *Geomicrobiology Journal*, 24, 19-29.
- PURDY, K. J., CRESSWELL-MAYNARD, T. D., NEDWELL, D. B., MCGENITY, T. J., GRANT, W. D., TIMMIS, K. N. & EMBLEY, T. M. 2004. Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. *Environmental Microbiology*, 6, 591-595.
- RAPPE, M. S., CONNOR, S. A., VERGIN, K. L. & GIOVANNONI, S. J. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 418, 630-633.
- REEVE, J. N., NOLLING, J., MORGAN, R. M. & SMITH, D. R. 1997. Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *J Bacteriol*, 179, 5975-86.
- REISER, R. & TASCH, P. 1960. Investigation of the viability of osmophile bacteria of great geological age. *Transactions of the Kansas Academy of Science. Kansas Academy of Science*, 63, 31-4.
- REISER, R., WILLIAMS, M. C. & SORRELS, M. F. 1960. The transport and dynamic state of exogenous glycerol- and palmitic acid-labeled tripalmitin. *Journal of lipid research*, 1, 241-7.
- REYSENBACH, A.-L. 2015a. Aquificales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd.
- REYSENBACH, A.-L. 2015b. Thermotogales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd.
- RHEIMS, H., SPROER, C., RAINEY, F. A. & STACHEBRANDT, E. 1996. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology-Uk*, 142, 2863-2870.
- RICHTER, M. & ROSSELLO-MORA, R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 19126-19131.
- RICHTER, M., ROSSELLO-MORA, R., GLOCKNER, F. O. & PEPLIES, J. 2016. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32, 929-931.
- RINKE, C., SCHWIENKE, P., SCZYRBA, A., IVANOVA, N. N., ANDERSON, I. J., CHENG, J.-F., DARLING, A., Malfatti, S., SWAN, B. K., GIES, E. A., DODSWORTH, J. A., HEDLUND, B. P., TSAMIS, G., SIEVERT, S. M., LIU, W.-T., EISEN, J. A., HALLAM, S. J., KYRPIDES, N. C., STEPANAUSKAS, R., RUBIN, E. M., HUGENHOLTZ, P. & WOYKE, T. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499, 431-437.
- ROBERTS, M. F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1, 5-5.

- ROBERTSON, C. E., SPEAR, J. R., HARRIS, J. K. & PACE, N. R. 2009. Diversity and Stratification of Archaea in a Hypersaline Microbial Mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1801-1810.
- RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F. & RAMOS-CORMENZANA, A. 1979. Isolation of Extreme Halophiles from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 164-165.
- ROEDDER, E. 1990. Fluid inclusion analysis - PROLOGUE AND EPILOGUE. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54, 495-507.
- ROUCHY, J. M. & CARUSO, A. 2006. The Messinian salinity crisis in the Mediterranean basin: A reassessment of the data and an integrated scenario. *Sedimentary Geology*, 188, 35-67.
- ROUCHY, J. M., SUC, J. P., FERRANDINI, J. & FERRANDINI, M. 2006. The Messinian Salinity Crisis revisited. *Sedimentary Geology*, 188, 1-8.
- RUSCH, D. B., HALPERN, A. L., SUTTON, G., HEIDELBERG, K. B., WILLIAMSON, S., YOOSEPH, S., WU, D., EISEN, J. A., HOFFMAN, J. M., REMINGTON, K., BEESON, K., TRAN, B., SMITH, H., BADEN-TILLSON, H., STEWART, C., THORPE, J., FREEMAN, J., ANDREWS-PFANNKUCH, C., VENTER, J. E., LI, K., KRAVITZ, S., HEIDELBERG, J. F., UTTERBACK, T., ROGERS, Y.-H., FALCON, L. I., SOUZA, V., BONILLA-ROSSO, G., EGUIARTE, L. E., KARL, D. M., SATHYENDRANATH, S., PLATT, T., BIRMINGHAM, E., GALLARDO, V., TAMAYO-CASTILLO, G., FERRARI, M. R., STRAUSBERG, R. L., NEALSON, K., FRIEDMAN, R., FRAZIER, M. & VENTER, J. C. 2007. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *Plos Biology*, 5, 398-431.
- SASS, A. M., MCKEW, B. A., SASS, H., FICHTEL, J., TIMMIS, K. N. & MCGENITY, T. J. 2008. Diversity of Bacillus-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *Saline Systems*, 4, 8-8.
- SASS, A. M., SASS, H., COOLEN, M. J. L., CYPIONKA, H. & OVERMANN, J. 2001. Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania basin, Mediterranean Sea). *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5392-5402.
- SATTERFIELD, C. L., LOWENSTEIN, T. K., VREELAND, R. H., ROSENZWEIG, W. D. & POWERS, D. W. 2005. New evidence for 250 Ma age of halotolerant bacterium from a Permian salt crystal. *Geology*, 33, 265-268.
- SCHINK, B. & ZEIKUS, J. G. 1980. Microbial methane formation- A major end product of pectin metabolism. *Current Microbiology*, 4, 387-389.
- SCHUT, F., DEVRIES, E. J., GOTTSCHAL, J. C., ROBERTSON, B. R., HARDER, W., PRINS, R. A. & BUTTON, D. K. 1993. Isolation of typical marine-bacteria by dilution culture- Growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2150-2160.

- SCHWARTZ, W. 1979. D. J. KUSHNER (Editor). Microbial Life in Extreme Environments. XII und 465 S., 15 Abb., 36 Tab., 1 Taf. (farbig). London – New York – San Francisco 1978. Academic Press. \$ 19.60. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 19, 447-447.
- SONG, J., OH, H.-M. & CHO, J.-C. 2009. Improved culturability of SAR11 strains in dilution-to-extinction culturing from the East Sea, West Pacific Ocean. *FEMS Microbiology Letters*, 295, 141-147.
- SORO, V., DUTTON, L. C., SPRAGUE, S. V., NOBBS, A. H., IRELAND, A. J., SANDY, J. R., JEPSON, M. A., MICARONI, M., SPLATT, P. R., DYMOCK, D. & JENKINSON, H. F. 2014. Axenic Culture of a Candidate Division TM7 Bacterium from the Human Oral Cavity and Biofilm Interactions with Other Oral Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 6480-6489.
- SOROKIN, D. Y., ABBAS, B., MERKEL, A. Y., RIJPSRA, W. I. C., DAMSTÉ, J. S. S., SUKHACHEVA, M. V. & VAN LOOSDRECHT, M. C. M. 2015. *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 3739-3745.
- SOROKIN, D. Y., KUBLANOV, I. V., YAKIMOV, M. M., RIJPSRA, W. I. C. & SINNINGHE DAMSTÉ, J. S. 2016. *Halanaeroarchaeum sulfurireducens* gen. nov., sp. nov., the first obligately anaerobic sulfur-respiring haloarchaeon, isolated from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 2377-2381.
- SOROKIN, D. Y., TOUROVA, T. P., LYSENKO, A. M. & MUYZER, G. 2006. Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology-Sgm*, 152, 3013-3023.
- SPRENGER, W. W., VAN BELZEN, M. C., ROSENBERG, J., HACKSTEIN, J. H. P. & KELTJENS, J. T. 2000. *Methanomicrococcus blatticola* gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1989-1999.
- SPRING, S., SCHEUNER, C., LAPIDUS, A., LUCAS, S., DEL RIO, T. G., TICE, H., COPELAND, A., CHENG, J. F., CHEN, F., NOLAN, M., SAUNDERS, E., PITLUCK, S., LIOLIOS, K., IVANOVA, N., MAVROMATIS, K., LYKIDIS, A., PATI, A., CHEN, A., PALANIAPPAN, K., LAND, M., HAUSER, L., CHANG, Y. J., JEFFRIES, C. D., GOODWIN, L., DETTER, J. C., BRETTIN, T., ROHDE, M., GOKER, M., WOYKE, T., BRISTOW, J., EISEN, J. A., MARKOWITZ, V., HUGENHOLTZ, P., KYRPIDES, N. C. & KLENK, H. P. 2010. The Genome Sequence of *Methanohalophilus mahii* SLPT Reveals Differences in the Energy Metabolism among Members of the *Methanosarcinaceae* Inhabiting Freshwater and Saline Environments. *Archaea-an International Microbiological Journal*.
- STACKEBRANDT, E. E., J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*, 33, 152-155.

- STAN-LOTTER, H., MCGENITY, T. J., LEGAT, A., DENNER, E. B., GLASER, K., STETTER, K. O. & WANNER, G. 1999. Very similar strains of *Halococcus salifodinae* are found in geographically separated permo-triassic salt deposits. *Microbiology*, 145, 3565-74.
- TAKAI, K., NAKAMURA, K., TOKI, T., TSUNOGAI, U., MIYAZAKI, M., MIYAZAKI, J., HIRAYAMA, H., NAKAGAWA, S., NUNOURA, T. & HORIKOSHI, K. 2008. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 10949-10954.
- TANSEY, M. R. & BROCK, T. D. 1972. The upper temperature limit for eukaryotic organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 2426-8.
- TASCH, P. 1963. PALEOECOLOGICAL CONSIDERATIONS OF GROWTH AND FORM OF FOSSIL PROTISTS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 108, 437-&.
- THAUER, R. K. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology*, 144, 2377-406.
- THAUER, R. K., KASTER, A.-K., SEEDORF, H., BUCKEL, W. & HEDDERICH, R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol*, 6.
- TRIPP, H. J., KITNER, J. B., SCHWALBACH, M. S., DACEY, J. W. H., WILHELM, L. J. & GIOVANNONI, S. J. 2008. SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth. *Nature*, 452, 741-744.
- UENO, Y., YAMADA, K., YOSHIDA, N., MARUYAMA, S. & ISOZAKI, Y. 2006. Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era. *Nature*, 440, 516-519.
- VALLENET, D., BELDA, E., CALTEAU, A., CRUVEILLER, S., ENGELEN, S., LAJUS, A., LE FEVRE, F., LONGIN, C., MORNICO, D., ROCHE, D., ROUY, Z., SALVIGNOL, G., SCARPELLI, C., SMITH, A. A. T., WEIMAN, M. & MEDIGUE, C. 2013. MicroScope-an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Research*, 41, E636-E647.
- VALLENET, D., ENGELEN, S., MORNICO, D., CRUVEILLER, S., FLEURY, L., LAJUS, A., ROUY, Z., ROCHE, D., SALVIGNOL, G., SCARPELLI, C. & MEDIGUE, C. 2009. MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database-the Journal of Biological Databases and Curation*.
- VALLENET, D., LABARRE, L., ROUY, Z., BARBE, V., BOCS, S., CRUVEILLER, S., LAJUS, A., PASCAL, G., SCARPELLI, C. & MEDIGUE, C. 2006. MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Research*, 34, 53-65.
- VAN DER WIELEN, P., BOLHUIS, H., BORIN, S., DAFFONCHIO, D., CORSELLI, C., GIULIANO, L., D'AURIA, G., DE LANGE, G. J., HUEBNER, A., VARNAVAS, S. P., THOMSON, J., TAMBURINI,

- C., MARTY, D., MCGENITY, T. J., TIMMIS, K. N. & BIODEEP SCI, P. 2005. The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science*, 307, 121-123.
- VAN DER WIELEN, P. W. J. J. & HEIJES, S. K. 2007. Sulfate-reducing prokaryotic communities in two deep hypersaline anoxic basins in the Eastern Mediterranean deep sea. *Environmental Microbiology*, 9, 1335-1340.
- VANWONTERGHEM, I., EVANS, P. N., PARKS, D. H., JENSEN, P. D., WOODCROFT, B. J., HUGENHOLTZ, P. & TYSON, G. W. 2016. Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nature Microbiology*, 1.
- VENTER, J., REMINGTON, K., HEIDELBERG, J., HALPERN, A., RUSCH, D., EISEN, J., WU, D., PAULSEN, I., NELSON, K. & NELSON, W. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66 - 74.
- VREELAND, R. H. 2007. Isolation of live Cretaceous (121-112 million years old) halophilic Archaea from primary salt crystals (vol 24, pg 275, 2007). *Geomicrobiology Journal*, 24, 545-545.
- VREELAND, R. H. 2015. Halomonas. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd.
- VREELAND, R. H., JONES, J., MONSON, A., ROSENZWEIG, W. D., LOWENSTEIN, T. K., TIMOFEEFF, M., SATTERFIELD, C., CHO, B. C., PARK, J. S., WALLACE, A. & GRANT, W. D. 2007. Isolation of live Cretaceous (121-112 million years old) halophilic Archaea from primary salt crystals. *Geomicrobiology Journal*, 24, 275-282.
- VREELAND, R. H., ROSENZWEIG, W. D. & POWERS, D. W. 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407, 897-900.
- WALLMANN, K., AGHIB, F. S., CASTRADORI, D., CITA, M. B., SUESS, E., GREINERT, J. & RICKERT, D. 2002. Sedimentation and formation of secondary minerals in the hypersaline Discovery Basin, eastern Mediterranean. *Marine Geology*, 186, 9-28.
- WALLMANN, K., SUESS, E., WESTBROOK, G. H., WINCKLER, G. & CITA, M. B. 1997. Salty brines on the Mediterranean sea floor. *Nature*, 387, 31-32.
- WATKINS, A. J., ROUSSEL, E. G., WEBSTER, G., PARKES, R. J. & SASS, H. 2012. Choline and N,N-Dimethylethanolamine as Direct Substrates for Methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8298-8303.
- WATVE, M., SHEJVAL, V., SONAWANE, C., RAHALKAR, M., MATAPURKAR, A., SHOUCHE, Y., PATOLE, M., PHADNIS, N., CHAMPHENKAR, A., DAMLE, K., KARANDIKAR, S., KSHIRSAGAR, V. & JOG, M. 2000. The 'K' selected oligophilic bacteria: A key to uncultured diversity? *Current Science*, 78, 1535-1542.

- WAYNE, L. G., BRENNER, D. J., COLWELL, R. R., GRIMONT, P. A. D., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M. I., MOORE, L. H., MOORE, W. E. C., MURRAY, R. G. E., STACKEBRANDT, E., STARR, M. P. & TRUPER, H. G. 1987. REPORT OF THE AD-HOC-COMMITTEE ON RECONCILIATION OF APPROACHES TO BACTERIAL SYSTEMATICS. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 463-464.
- WHEELER, D. A. 1985. An analysis of the aeolian dustfall on eastern Britain, November 1984. *Proceedings of the Yorkshire Geological and Polytechnic Society*, 45, 307-309.
- WHITAKER, R. J., GROGAN, D. W. & TAYLOR, J. W. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, 301, 976-978.
- WILHARM, T., ZHILINA, T. N. & HUMMEL, P. 1991. DNA-DNA hybridization of methylotrophic halophilic methanogenic bacteria and transfer of *Methanococcus halophilus* to the genus *Methanohalophilus* as *Methanohalophilus halophilus* Comb-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 558-562.
- WOESE, C. R. & FOX, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5088-5090.
- WOESE, C. R., FOX, G. E., ZABLEN, L., UCHIDA, T., BONEN, L., PECHMAN, K., LEWIS, B. J. & STAHL, D. 1975. Conservation of primary structure in 16S Ribosomal-RNA. *Nature*, 254, 83-86.
- WOESE, C. R., KANDLER, O. & WHEELIS, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Nat Acad Sci*, 87.
- WOLFE, R. S. 1996. 1776-1996: Alessandro Volta's combustible air. *Asm News*, 62, 529-534.
- YAKIMOV, M. M., GIULIANO, L., CAPPELLO, S., DENARO, R. & GOLYSHIN, P. N. 2007a. Microbial community of a hydrothermal mud vent underneath the deep-sea anoxic brine Lake Urania (eastern Mediterranean). *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 37, 177-188.
- YAKIMOV, M. M., LA CONO, V., DENARO, R., D'AURIA, G., DECEMBRINI, F., TIMMIS, K. N., GOLYSHIN, P. N. & GIULIANO, L. 2007b. Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L'Atalante, Eastern Mediterranean Sea. *Isme Journal*, 1, 743-755.
- YAKIMOV, M. M., LA CONO, V., SLEPAK, V. Z., LA SPADA, G., ARCADI, E., MESSINA, E., BORGHINI, M., MONTICELLI, L. S., ROJO, D., BARBAS, C., GOLYSHINA, O. V., FERRER, M., GOLYSHIN, P. N. & GIULIANO, L. 2013a. Microbial life in the Lake Medee, the largest deep-sea salt-saturated formation. *Scientific Reports*, 3, 3554.
- YAKIMOV, M. M., LA CONO, V., SLEPAK, V. Z., LA SPADA, G., ARCADI, E., MESSINA, E., BORGHINI, M., MONTICELLI, L. S., ROJO, D., BARBAS, C., GOLYSHINA, O. V., FERRER, M., GOLYSHIN, P.

- N. & GIULIANO, L. 2013b. Microbial life in the Lake Medee, the largest deep-sea salt-saturated formation. *Scientific Reports*, 3.
- YAKIMOV, M. M., LA CONO, V., SPADA, G. L., BORTOLUZZI, G., MESSINA, E., SMEDILE, F., ARCADI, E., BORGHINI, M., FERRER, M., SCHMITT-KOPPLIN, P., HERTKORN, N., CRAY, J. A., HALLSWORTH, J. E., GOLYSHIN, P. N. & GIULIANO, L. 2015a. Microbial community of the deep-sea brine Lake Kryos seawater-brine interface is active below the chaotropicity limit of life as revealed by recovery of mRNA. *Environmental Microbiology*, 17, 364-382.
- YAYANOS, A. A., DIETZ, A. S. & VAN BOXTEL, R. 1981. Obligately barophilic bacterium from the Mariana trench. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 5212-5.
- ZEIKUS, J. G. 1983. METABOLISM OF ONE-CARBON COMPOUNDS BY CHEMOTROPIC ANAEROBES. *Advances in Microbial Physiology*, 24, 215-299.
- ZHARKOV, M. A. & *I*ANSHIN, A. L. 1981. *History of Paleozoic salt accumulation*, Berlin ; New York, Springer Verlag.
- ZHILINA, T. N. 1983. New obligate halophilic methane-producing bacterium. *Microbiology*, 52, 290-297.
- ZHILINA, T. N. & ZAVARZIN, G. A. 1987. Methanohalophilus evestigatus gen.nov., sp.nov., extremely halophilic methane forming archebacterium. *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 293, 464-468.
- ZHILINA, T. N. & ZAVARZIN, G. A. 1990. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic-bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 87, 315-321.
- ZHILINA, T. N., ZAVARZINA, D. G., KEVBRIN, V. V. & KOLGANOVA, T. V. 2013. *Methanocalculus natronophilus* sp nov., a new alkaliphilic hydrogenotrophic methanogenic archaeon from a soda lake, and proposal of the new family *Methanocalculaceae*. *Microbiology*, 82, 698-706.
- ZHUANG, G.-C., ELLING, F. J., NIGRO, L. M., SAMARKIN, V., JOYE, S. B., TESKE, A. & HINRICHS, K.-U. 2016. Multiple evidence for methylotrophic methanogenesis as the dominant methanogenic pathway in hypersaline sediments from the Orca Basin, Gulf of Mexico. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 187, 1-20.
- ZOLENSKY, M. E., BODNAR, R. J., GIBSON, E. K., NYQUIST, L. E., REESE, Y., SHIH, C. Y. & WIESMANN, H. 1999. Asteroidal water within fluid inclusion-bearing halite in an H5 chondrite, Monahans (1998). *Science*, 285, 1377-1379.
- ZUCKERKANDL, E. & PAULING, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8, 357-+.

Annexes

Annexe.

Annexe 1: Présentation du chapitre du livre rédigé pour le livre « The Marine Microbiome ».

Chapter 15

New Approaches to the Unculture

Stéphane L’Haridon, Lynn Paterson, Frederique Duthoit

Abstract It took more than 10 years to cultivate “*Pelagibacter ubique*”. Although it was first isolated based on rRNA gene sequences, its growth medium has only recently been developed as a result of the improvement and knowledge of metabolic pathways. Modern approaches now offer a new perspective on this organism, a new point of view, a new paradigm, regarded as “not yet cultured” but an innovative and promising approach to include micro-engineering, high-throughput cultivation, and systems biology.

S. L’Haridon (✉) · F. Duthoit
Laboratoire de Microbiologie
Place Nicolas Copernic, Université de Bordeaux
UBO, CNRS, IFREMER 63000 Mérignac
e-mail: stephane.lharidon@univ-bordeaux.fr

F. Duthoit
e-mail: frederique.duthoit@univ-bordeaux.fr

G. Le Blay
e-mail: gwenaelle.leblay@univ-bordeaux.fr

G.H. Markx · L. Paterson
School of Engineering and Biophysics and Bioengineering
Edinburgh, Scotland, UK
e-mail: G.H.Markx@hw.ac.uk

L. Paterson
e-mail: L.Paterson@hw.ac.uk

C.J. Ingham
MicroDish BV, Utrecht, The Netherlands
e-mail: c.ingham@microdish.nl

© Springer International Publishing
L.J. Stal and M.S. Cretoiu
DOI 10.1007/978-3-319-33193-3

detection or targeting specific microorganisms. Culture remains a prerequisite for microbiological studies, as we need to grow microorganisms in the laboratory in order to identify their functions and validate hypotheses deduced from their genomes. The development, improvement, and combination of innovative culture techniques based on information deduced from omics will undoubtedly lead to the isolation and study of presently uncultured marine microorganisms.

15.1 Introduction

Microorganisms populate all marine habitats with an estimated abundance of 10^4 to 10^6 cells/ml of seawater. Marine microorganisms play key roles in biogeochemical cycling processes including carbon and nutrient cycling. During the past three decades, the revolution in molecular biology, combined with technological advances and a decrease in sequencing costs, has allowed genomic studies to be performed on ocean microbial communities at a worldwide scale (Kopf et al. 2015; Rusch et al. 2007; Venter et al. 2004). The 16S rRNA gene sequence-based approaches and environmental genomics have revealed the vast diversity of the microbial world. Most of the organisms detected by these approaches had never been described before, even after 120 years of culturing microorganisms. These organisms are known as “not culturable” and represent the dark matter of the microbial domain. More than 99 % of microbial diversity is not yet culturable. The establishment of pure cultures of representatives of all bacterial and archaeal divisions is still a major challenge for microbiologists today. Pure cultures continue to be essential for a true understanding of the physiology of these Bacteria and Archaea and their roles in the environment, and to enable the discovery of new products with biotechnological potentials such as new antibiotics.

During the last two decades, considerable advances have been made in culture approaches making it possible to grow some important “key-player” microorganisms in the laboratory. These advances were not brought about by a revolution or overnight breakthrough in culture methods, but by a gradual improvement in existing methods, and a renewed understanding that the “sea” is an oligotrophic medium with a low abundance of microbial cells, living together.

The aim of this chapter is to provide an overview of the new strategies and technologies used by microbiologists to enhance the isolation and culture of marine microorganisms. Some important aspects, such as the preparation of the growth medium, incubation time, and sensitivity of detection methods for cell growth are first introduced. This is followed by a description of some of the most important technological developments, i.e., high-throughput and automated dilution-to-extinction methods, microencapsulation and immobilization of microorganisms in community cultures, the development of membrane-based cultivation chips for cell enrichment and cultivation, and single-cell techniques for cell isolation.

15.2 Medium

In 1941, Claude Zobell, a pioneer in the study of marine microorganisms, introduced the marine agar 2216 medium (known as Marine Broth), a nutrient-rich medium, which made possible the isolation of many heterotrophic bacteria, mainly belonging to a small number of genera, including *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Oceanospirillum*, *Aeromonas*, *Deleya*, *Flavobacterium*, *Alteromonas*, and *Marinomonas*. Using nutrient-rich liquid or solid medium at the enrichment step favors faster-growing bacteria, referred to as “r”-strategists, at the expense of slow-growing, “K”-strategist, bacteria (Watve et al. 2000). K-strategists represent the dominant microorganisms in the pelagic environment. Natural seawater is a complex and living environment and it is difficult to prepare an artificial sea medium that suitably mimics it, providing all the nutrients necessary to sustain microbial growth. With the exception of the precise salt composition, which can be easily achieved, the concentration and sources of organic matter, nitrogen, phosphate, sulfur, trace mineral elements, cofactors, and vitamins and the reconstruction of the carbonate buffer are important factors that often determine the success or failure of enrichment and isolation attempts. Marine Broth 2216 medium has 170 times more dissolved organic carbon than natural seawater, which inhibits the growth of the true oligotrophs that represent the majority of microorganisms present in the ocean. It was only in 1993 when D.K. Button and colleagues started using natural seawater with small amounts of inoculum for isolating marine bacteria. This work resulted in the description of two new oligotrophs, *Sphingomonas alaskensis* and *Cycloclasticus oligotrophus* (Button et al. 1998; Schut et al. 1993; Vancanneyt et al. 2001). The concept of using natural seawater as a growth medium and low cell numbers as inoculum was improved upon two decades later in Giovannoni’s laboratory, allowing the isolation of members of the SAR11 clade, one of the most dominant clades of Alphaproteobacteria in the ocean (Cho and Giovannoni 2004; Connon and Giovannoni 2002; Rappe et al. 2002). “*Candidatus Pelagibacter ubique*” was cultured in an artificial seawater medium with specific nutrients (Carini et al. 2013). The medium was defined based on the metabolic reconstruction of the *Ca. P. ubique* genome (Giovannoni et al. 2005), which revealed that the genes necessary for assimilatory sulfate reduction were absent (Tripp et al. 2008). The common genes for serine and glycine biosynthesis were also absent and the bacterium was later found to be auxotrophic for the thiamin precursor HMP (Carini et al. 2014). Employing the environment itself as aiding in growing microorganisms has enabled the culture of numerous previously uncultured isolates from different clades.

Marine Crenarchaeota are now recognized as a dominant fraction of the plankton in deep ocean waters. Konneke et al. (2005) used natural seawater from an aquarium as the first step in an attempt to enrich the fraction of Marine Group I Crenarchaeota. After several transfers and the addition of bacterial antibiotics (streptomycin) the fraction of Crenarchaeota increased up to 90 % of the total

community. Subsequently, “*Nitrosopumilus maritimus*” strain SCM1 was isolated in a synthetic medium.

Only a small proportion of viable cells present in microbial communities can be grown using growth media based on agar (or other gelling agents), an enigma known as the “great plate count anomaly” (Staley and Konopka 1985). The diversity of marine microorganisms obtained after streaking on solid medium may depend on the gelling agent used for their isolation (Joint et al. 2010). A hidden pitfall was revealed in the common preparation of solid medium. The simultaneous addition of phosphate and agar prior to autoclaving causes the formation of hydrogen peroxide in the medium, which inhibits the growth of microorganisms. The separation of phosphate and agar before the autoclave step allows the development of numerous colonies, among which over 30 % previously uncultured organisms (Tanaka et al. 2014).

Finally, it appears that medium based on natural seawater taken on the sampling site, in the first step of enrichment/isolation improves the growth of presently untamed microorganisms. The number of “uncultured” species domesticated in artificial media is also increased by several prior-growing periods in natural seawater (Nichols et al. 2010).

15.3 Incubation Time

An important aspect of the culturing of abundant and dominant marine microorganisms is incubation time. Long incubation times are needed to allow the growth of key players such as members of the SAR11 clade. Song et al. (2009) demonstrated that after 20–24 weeks of incubation, 64–82 % of the total number of isolates belongs to SAR11. Members of the Roseobacter clade are abundant in seawater and have been detected in many marine habitats. A new genus, *Planktomarina* gen. nov., of the Roseobacter clade was described, after it was isolated after an incubation time of 7 weeks (Giebel et al. 2013). Hahnke et al. (2015) incubated samples for three months after an algal bloom and isolated novel abundant bacterioplankton species. The autotrophic ammonia-oxidizing archaeon strain SCM1 required an enrichment period of 6 months before being isolated. Under optimal conditions, strain SCM1 reaches the stationary phase after 20 days of incubation, which indicates that long incubation times are necessary to culture members of this clade.

A long period of incubation is an important factor in the success of isolating environmentally relevant microorganisms, meaning that microbiologists have to be patient, although such time requirements are at odds with academic programs and increasing pressure to publish rapidly.

15.4 Measurement of Microbial Growth and Detection Sensitivity

Methods to measure cell density vary in terms of sensitivity and time requirements. For a long time, microbiologists assessed microbial growth based on the turbidity they observed in the inoculated liquid medium. Measurement of turbidity is fast and easy to perform. It is therefore still frequently used, but the disadvantage of this technique is the rather low sensitivity. Many cultures have been discarded because they apparently displayed no visible growth, due to poor cell density. Microscopic measurements are more sensitive but, particularly in the case of epifluorescence microscopy, they are time-consuming. Flow cytometry has a high sensitivity, the counting procedure is fast and simple, but requires strong expertise and a careful setting up of the equipment. During the last few decades, cheaper and easy-to-use flow cytometers have been introduced and are now common equipment in research laboratories.

New protocols have been developed to access high-throughput isolation and culture microorganisms on a microplate format. In Giovannoni's laboratory, two approaches have been used: first, a 48-microarray filter device was developed in order to decrease the growth detection limit and to permit cell numeration with densities as low as 10^3 cells/ml using 200- μ l aliquots of culture (Connon and Giovannoni 2002). Hahnke et al. (2015) then improved this method using a 96-well blotting manifold (Bio-Dot, Bio-Rad, Munich, Germany) and a vacuum pump (Millipore, Billerica, MA, USA) under low, non-disruptive pressure (<5 mm Hg). Formaldehyde-fixed samples were filtered directly onto 4-mm polycarbonate filters with a pore size of 0.2 μ m (GTTP, Millipore, Billerica, MA, USA), and stained with either $1 \times$ SYBR Green or 1 μ g/ml DAPI and mounted on glass slides with Citifluor and VectaShield (4:1).

In 2007, Stingl used a flow cytometer to enumerate cell densities after transferring samples of 200 μ l into a 96-well plate and staining with SYBR Green1, the detection limit was of the same order (Stingl et al. 2007). This method is fast, as it takes around 10 min to analyze a 96-well microplate. On the Cocagne platform (described below), the SYBR Green labeling method developed in 2006 by Martens-Habbena is used to quantify cell numbers. An aliquot of 100 μ l from a 96-well microplate is transferred to a black microplate containing 50 μ l of a SYBR Green solution (Martens-Habbena and Sass 2006). After 3 h of incubation in the dark, a microplate reader can detect the relative fluorescence units (RFU) at 485 nm in each well of the microplate. RFU is correlated with cell density. This method is also fast that it takes less than one minute to read a microplate with a detection limit at 2×10^5 cells/ml in seawater medium.

15.5 Targeting Microorganisms of Interest

High-throughput culturing (HTC) using dilution-to-extinction, culture chip, and single-cell isolation allows large number of isolates to be recovered. In order to screen the numerous cultures, different methods can be used to dereplicate the isolates or to target specific groups of microorganisms. Dereplication using restriction fragment length polymorphism (RFLP) after amplification of the 16S rRNA gene is convenient for clustering the isolates and identifying mixed cultures (Cho and Giovannoni 2004; Connon and Giovannoni 2002). The 48-array developed in Giovannoni's laboratory allowed Rappe et al. (2002) to use labeled oligonucleotide probes targeting the SAR11 cells (FISH) directly on the array filter. Hahnke et al. (2015) developed CARD-FISH on a 96-polycarbonate membrane to quantify and to identify the presence of different taxa with specific labeled probes.

15.6 Dilution-to-Extinction Method and High-Throughput Isolation

The dilution-to-extinction method introduced by Button et al. in 1993 was improved a decade later in Giovannoni's laboratory (Connon and Giovannoni 2002). The aim was to drastically decrease the number of cells inoculated per well to around 1–5 cells in a small volume of medium, with the idea that only one cell would grow in a well of a microplate and a pure culture would thus be obtained. The theoretical number of pure cultures was estimated by the equation $\mu = -n(1 - p) \ln(1 - p)$ and the estimation of culturability was given by $V = -\ln(1 - p)/X$, where μ is an estimation of the expected number of pure cultures, n is the number of inoculated wells, V is the estimated culturability, p is the proportion of wells positive for growth (wells positive for growth/total inoculated wells), and X is the initial inoculum of cells added per well. Utilization of microplates for culturing has introduced high throughput into the culture process. In a single round, Connon and Giovannoni (2002) incubated approximately 2500 extinction cultures. A culturability of up to 14.3 % was observed after three weeks of incubation, which is 120 times higher than obtained with classical methods. Cell densities were in the range of 1.3×10^3 to 1.6×10^6 cells/ml; densities that would be impossible to detect by measurement of turbidity. Many of the microorganisms that were cultured using this approach were unique cell lineages and included cultures related to the clones SAR11 (Alphaproteobacteria), OM43 (Betaproteobacteria, related to the methylotroph *Methylophilus methylotrophus*), SAR92 (Gammaproteobacteria), and OM60/OM241 (Gammaproteobacteria).

The Laboratory of Microbiology of Extreme Environments (UMR 6197 LM2E, Plouzané, France) has automated the high-throughput dilution-to-extinction method (Cocagne platform). A pipetting robot (Starlet, Hamilton) dispenses the medium (500 μ l/well) and the cells (1–3 cells/well) into the wells of 20 microplates loaded

onto the deck of the pipetting robot. Filter-sterilized natural seawater is used as growth medium, amended with micromole traces of nitrogen, phosphate, and a carbon source. A column with deep wells filled with sterile medium serves as control. The microplates are sealed with silicone caps and incubated at in situ temperature for at least two months. After incubation, the detection of growth in deep-well plates is done by labeling growing cells with SYBR Green followed by the detection of relative fluorescence compared to blanks using a microplate reader (Infinite® 200 PRO, Tecan). For this purpose, deep-well plates and dark microplates (Corning) are loaded on the robot's deck and the detection method programmed in the Hamilton software is started. All steps are automatically performed according to the program instructions. The pipetting robot first distributes 50 µl/well of the SYBR Green solution into the dark microplates (Corning), and then it transfers an aliquot (100 µl/well) of cell suspension from the deep-well plates to the dark microplates. After 3 h of incubation in the dark, the dark microplates are read on the microplate reader at 485 nm. Wells are considered to be positive when their relative fluorescence is higher than the average of the blanks (sterile medium) plus three times the value of the standard deviation of the blanks. The level of the relative fluorescence correlates with cell concentration. The positive wells of the twenty inoculated microplates, i.e., the wells with microbial growth, are then redistributed into new microplates with fresh medium. These newly inoculated deep-well plates are incubated under the same conditions as described above. A DNA extraction protocol, using the NucleoSpin 96 Tissue Kit (Macherey-Nagel) is programmed in the robot's software. The 16S rRNA gene is then amplified and sequenced. The Cocagne platform has been used on samples of coastal seawater of Brittany. Twenty microplates, in other words 1760 extinction cultures, were incubated in natural local seawater at 15 °C for three months. Two cells were inoculated per well and the culturability obtained was 14 %. DNA was extracted and partial sequences of the 16S rRNA gene from one hundred and fifty isolates were analyzed. The results indicate the presence of numerous novel genera and species affiliated to Alpha- and Gammaproteobacteria (L'Haridon, unpublished).

15.7 Cell Immobilization for Isolation and Cultivation of Marine Bacteria and Archaea

Microbial cell immobilization is a method that aims to fix microorganisms on the surface of or within specific carriers. This technique is commonly used in many fields including food, pharmaceutical, agricultural, therapeutic, environmental, and research applications (Cassidy et al. 1996). Many different strategies are employed. These include immobilization by binding (physical adsorption, ionic binding, or covalent binding) on an inert carrier, self-aggregation (flocculation or chemical cross-linking), encapsulation or entrapment (membrane entrapment or entrapment

within the network of a polymer matrix). Here we present applications of whole cell immobilization by entrapment in different polymer matrices for the isolation and culture of marine heterotrophic Bacteria and Archaea.

Cell entrapment in natural polymer matrices is the most frequently used technique because it is one of the gentlest protocols, inducing the highest cell viability (Kanasawud et al. 1989). The polymer matrix allows the diffusion of small molecules that sustain the viability, activity, and growth of the entrapped cells. In addition, cells are protected against attacks by bacteriophages, and from shear forces, abiotic stresses, and potential inhibitors that may be present in the culture medium. Moreover, entrapped cells are easily recovered from their growth environment (D'Souza 2002; Nussinovitch 2010). Polymer gels can be shaped in the form of beads, spherical geometry of which increases mass transfer compared to biofilms. Various methods, such as extrusion and emulsion, can be used to produce gel beads. In the extrusion method, an aqueous mixture containing polymers and microorganisms is extruded through a syringe to form beads that fall into a hardening solution. Bead size depends on the syringe orifice diameter, the concentration, temperature, viscosity and flow rate of the polymer solution, and the distance between the orifice and the hardening solution. The emulsion technique is based on a dispersion process in a two-phase system in which an aqueous solution containing polymers and microorganisms is dispersed in an oil/organic phase under agitation to form a water-in-oil emulsion. Temperature decrease induces the polymerization of beads that are then placed in a hardening solution (Kourkoutas et al. 2004; Rathore et al. 2013). Depending on the polymer, the hardening solution contains different types of cross-linking agents. The emulsion technique allows the production of gel beads of different diameters (5–5000 μm) depending on the emulsion conditions and agitation speed. Beads can be roughly separated into microbeads and macrobeads according to their size; macrobeads being greater than 100 μm in diameter (John et al. 2011). Because of the cell immobilization, free and immobilized populations do not have the same environmental conditions. As a result, immobilized cells have a different physiology and growth capacity compared to free-living cells (Doleyres et al. 2004; Rathore et al. 2013).

Many natural polymers (e.g., κ -carrageenan, gellan gum, agarose, agar, gelatin, alginate, chitosan) can be used for cell entrapment (Cachon et al. 1997). These polymers are usually cheap and can be used alone or in combination. However, they vary in toxicity, gelling properties, rheological behavior, and mechanical stability according to the conditions during the bead formation and incubation. The selection of the right polymer and encapsulation method is therefore critical depending on the type of application and microorganisms to be immobilized, in order to ensure cell viability while preserving the beads' mechanical stability, depending on culture conditions (especially salt concentration and temperature).

15.7.1 *Immobilization for the Isolation of Marine Microorganisms*

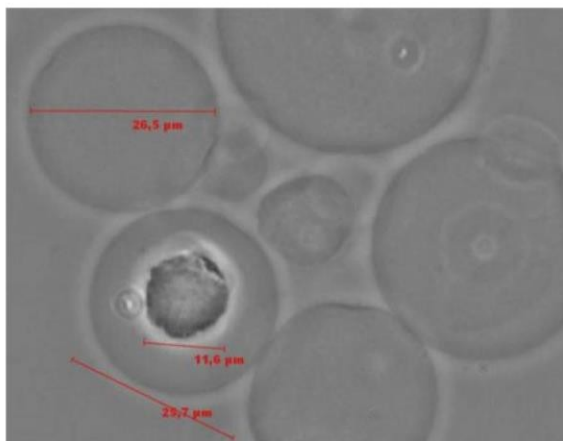
An original application of whole cell immobilization is the microencapsulation method developed by Zengler et al. (2002) for high-throughput culture and isolation of marine aerobic mesophilic microorganisms. The principle behind this method is the physical separation and massive parallel culture of cells that are individually entrapped in gel microdroplets (GMDs) of agarose (60 μm diameter) and incubated as a continuous community culture (flow rate 13 ml/h) in an HPLC column under low nutrient flux conditions for long incubation periods. This GMD community culture allows the exchange of metabolites and/or signaling molecules between the micro-colonies that grow within the GMDs, which are physically separated from each other. At the end of the continuous culture, GMDs containing micro-colonies are sorted by flow cytometry and further incubated in deep-well microplates (one GMD per well) for clonal enrichment in a rich organic medium. This technique was applied to different habitats and has provided more than 10,000 bacterial and fungal isolates per natural sample, including novel marine bacteria from previously uncultured groups (Zengler et al. 2002, 2005). It is a promising technique, although the critical step is the positive GMD sorting by flow cytometry, which may decrease cell viability. The use of a suitable cell sorter that can directly disperse the positive GMDs into microplate-wells is therefore important at this stage. In Zengler's publications (Zengler et al. 2002, 2005) GMDs were directly sorted and distributed into microplates by a FACSAria[®] flow cytometer.

The Laboratory of Microbiology of Extreme Environments (UMR 6197 LM2E, Plouzané, France) has automated the Zengler method using a Hamilton pipetting robot (Cocagne platform) for GMD distribution into deep-well microplates and growth detection by labeling of growing cells with SYBR Green, followed by the detection of the RFU compared with blanks using a microplate reader. Moreover, a protocol for the microencapsulation (60 μm beads) and culture of thermophilic marine cells in heat-stable microbeads made of gellan and agarose was also developed (Fig. 15.1).

The same microencapsulation method was also used for the isolation of slow-growing marine bacteria from mixed samples. Akselband et al. (2006) developed a new strategy based on the growth detection of individual cells encapsulated in agarose GMDs (30–50 μm in diameter). After 6 h growth in mixed culture, the slow-growing micro-colonies were sorted from fast growing ones by measuring their size within the GMD with a flow cytometer (EPICS EliteTM, Coulter) after LIVE/DEAD staining (*Bac* Light Bacterial Viability Kit), and transferred to fresh medium. Akselband et al. (2006) suggest the use of the same strategy for targeting specific activities using fluorogenic substrates for GMD sorting. In their study, they also showed that 75 % of the marine isolates grew faster in GMDs than in liquid medium.

Ben-Dov and collaborators developed another strategy for the isolation of marine aerobic mesophilic microorganisms using a macro-encapsulation technique

Fig. 15.1 Development of a bacterial colony inside a GMD at 65 °C



(Ben-Dov et al. 2009). After dilution of environmental samples, microbial cells were individually entrapped in agar beads (1–3 mm), which were then coated with a porous polysulfonic polymeric membrane. This type of membrane prevents agar dehydration but enables the exchange of molecules (nutrients and waste). After sterilization of the surfaces with alcohol, the beads were placed in a suitable simulated or natural environment for long periods of incubation (at least 3 weeks). Then, the beads were recovered and sterilized by flaming, and the embedded agar spheres were removed, flattened, and observed under the microscope for the presence of microbial colonies. In order to enrich and isolate microorganisms, the agar beads were diluted and remixed with warm agar to form new beads. The coated beads were then repeatedly incubated in the appropriate environment. Following every two to three transfers, colonies were streaked onto appropriate agar plates. This labor-intensive technique was successful in growing several novel microorganisms from different environments, including the mucus layer of the Red Sea coral *Fungia granulosa*.

15.7.2 Immobilization for Increasing Cell Growth Efficiency and Stability

Entrapment of mesophilic aerobic marine microorganisms within polymer matrices (usually alginate) in pure culture or as consortia is used in environmental applications (such as biosensor and in bioremediation) (Cassidy et al. 1996; Futra et al. 2014) and in biotechnological applications in bioreactors (biomass and metabolite production and waste water treatment) (Roy 2015). Cell entrapment has been used for the culture of thermophilic strains (Kanasawud et al. 1989; Klingenberg et al. 1990; Norton and Lacroix 2000) but never for marine (hyper)thermophilic anaerobic microorganisms because of the difficulties of gelling properties in a saline

environment. However, cell entrapment offers numerous advantages over free-cell cultures in bioreactors (Bustard et al. 2000). Cell entrapment induces a much more stable and robust continuous culture system because it prevents cell washout, improves genetic stability, protects organisms against shear forces and possible presence of toxic compounds in the culture medium whilst increasing cell numbers and product yields (Rathore et al. 2013). Moreover, immobilization facilitates separation between biomass and products and makes possible the reusability of the beads with immobilized cells.

The Laboratory of Microbiology of the Extreme Environments (UMR 6197 LM2E, Plouzané, France) has developed a cell entrapment protocol for (hyper) thermophilic marine microorganisms in order to improve the cultivation of deep-sea hydrothermal microbial communities. An experimental design, set to evaluate different incubation conditions (pH, temperature, salt, and sulfur), showed that beads (1–2 mm diameter) made of a mixture of heat-stable polymers (gellan and xanthan gums) were resistant to most incubation conditions. After 5 weeks of incubation, beads showed good resistance to all tested conditions (Fig. 15.2), except those simultaneously including high temperature (100 °C), low NaCl concentration (<30 g/l), and extreme pH (≤ 4 or ≥ 8). Batch experiments under nitrogen gas using Ravot medium (Gorlas et al. 2013) showed that thermophilic (*Thermosipho* sp. DSM 101094) and hyperthermophilic (*Thermococcus* sp. KOD1) microorganisms were effectively immobilized in beads and grew to high cell numbers. Cell counting by regular methods is impossible in polymer beads. Therefore, a protocol based on cellular ATP measurement was developed and applied to beads and culture medium. The correlation between cell counting using a Thoma cell counting chamber and ATP values was determined for each tested sample in order to determine the number of cells/ml for each strain. The ATP content of bacterial suspensions in the liquid culture media was determined using a Kikkoman Lumitester C-110 (Isogen Life Science) in combination with the

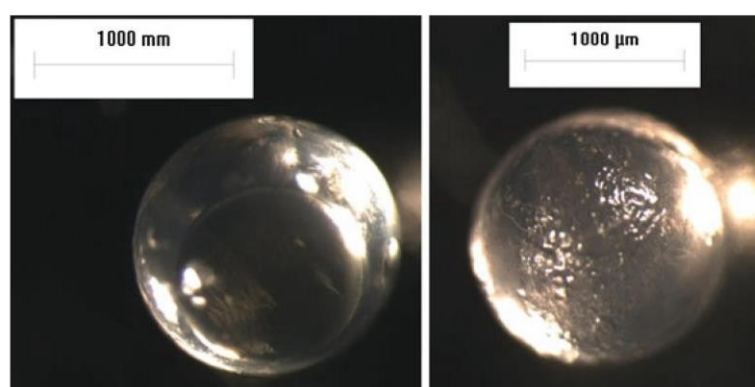


Fig. 15.2 Beads observation using a binocular magnifying glass (magnification $\times 2.4$) after immobilization 5-week incubation

BacTiter-Glo Microbial Cell Viability assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. In the case of beads, *ca* 100 mg of beads was placed in a pre-weighted sterile hemolysis tube (Gosselin). Subsequently, the beads were washed thrice with 100 μ l of sterile degassed saline solution. For ATP measurement, 100 μ l of sterile distilled water was added to the beads, which were vortexed for 10 s before adding 100 μ l of BacTiter-Glo buffer. As for liquid medium, internal calibration was performed with 10 μ l of a 100 nm ATP solution and maximal fluorescence emission values were considered. The number of active cells was 2.4×10^5 cells/g of beads for *Thermosipho* sp. (DSM 101094) and 2.3×10^6 cells/g of beads for *T. kodakarensis* (KOD1) just after immobilization, which corresponds to 2.7 and 54 % of cells surviving the immobilization step, respectively. After a few hours, cells grew within the beads as well as in the liquid medium. The cultures reached cell densities of 6.1×10^8 cells/ml in liquid medium and 2.9×10^7 cells/g in beads after 24 h incubation at 65 °C for *Thermosipho* sp. (DSM 101094), compared to 2.5×10^8 cells/ml for free-cell culture under the same conditions. In the case of *T. kodakarensis* (KOD1) the highest cell densities were obtained at 70 °C with 3.3×10^8 cells/ml and 4.8×10^7 cells/g in liquid medium and in beads, respectively, after 24 h incubation compared to 1.4×10^8 cells/ml in free-cell suspension medium. The high percentage of survival together with the high cell densities of both strains in beads and liquid medium showed that entrapment and culture of immobilized anaerobic thermophilic and hyperthermophilic marine strains is possible at high temperature (Landreau et al. submitted).

Using the same entrapment protocol, the proof of concept was established in a continuous culture that was performed for 42 days in a gas-lift bioreactor flushed with nitrogen and containing 40 % (v/v) of freshly inoculated beads with different thermophilic and hyperthermophilic deep-sea microorganisms. Gel beads proved to be highly resistant to mechanical and chemical degradation during the 42 days of continuous culture. Moreover, cell quantification, organic acid concentrations, and ATP monitoring showed that polymer beads and effluents were highly colonized and that the microorganisms were reactive to culture conditions.

15.8 Enrichment Chambers and Culture Chips

The environment is often an excellent growth medium (Ferrari et al. 2008; Kaeberlein et al. 2002) and this forms the basis of many laboratory cultivation techniques. We can build better and smaller culturing devices. These devices are laboratory-on-a-chip (LOC) or micro-engineering (MEMS) approaches for which the technologies are in part derived from the electronics industry that is entering life sciences (Ingham and van Hylckama 2008; Weibel et al. 2007). Therefore, microbiologists have access to improved manufacturing and design capabilities leading to the creation of sampling and culture devices for the laboratory or for implantation in the natural environment. This is both intuitively obvious and experimentally supported. Logically, we want to either move the laboratory into the

environment or the environment into the laboratory in order to recreate the missing factors that act as roadblocks to cultivation. Here we deal with culture chambers (laboratory into environment) and culture chips (environment into laboratory) as examples of technological advances that use this idea.

15.8.1 Porous In Situ Cultivation Chambers

Porous cages and chambers allow the culture system to be placed in the appropriate environment. Whilst even this measure is not a perfect recreation, such systems have shown great value in culturing otherwise refractory microorganisms. One simple but effective version is a diffusion chamber bounded by two membranes (Fig. 15.3a). This chamber is filled with agar lacking nutrients and inoculated with an environmental sample and then sealed (Kaeberlein et al. 2002). The diffusion chamber can be placed in the sea or in soil, or a close simulation of the environment (e.g., sediment in an aquarium), and the external conditions rapidly equilibrate with the small volume of the interior. Micro-colonies trapped within the agar can often then be cultured conventionally, whilst closely positioned micro-colonies can be investigated for the possibility that culturing required interactions between different species. This technique has resulted in the enrichment of previously uncultured organisms, up to 30 % success in culturing microorganisms from marine and littoral habitats. A logical extension of this idea is the iChip, a highly multiplexed version of the diffusion chamber (Fig. 15.3b). The iChip allows multiple polyoxymethylene (a hydrophobic plastic) chambers to be enclosed with two polycarbonate membranes (Nichols et al. 2010). The chambers are loaded with agarose before the second membrane is put in place, dipped in the appropriate environmental sample to inoculate, sealed and implanted into soil.

A notable success of the iChip was the use of these devices in a screening of up to 10,000 micro-colonies in order to isolate an example of a new class of antibiotics, teixobactin, from *Eleftheria terrae*, a group of Bacteria not previously known to be a good source of antimicrobials (Ling et al. 2015). The iChip uses an additional strategy when looking for antimicrobials. The first line of activity screening is performed by recovering the device, then spread plating the upper membrane with indicator bacteria. In the first instance, the microorganisms grow inside the micro-wells, sandwiched between two membranes allowing entry of small molecular weight compounds such as nutrients and quorum sensing molecules that support growth. In the second stage, antimicrobials diffuse from the trapped micro-colonies to an indicator strain on the outer surface to be assayed. The high frequency of “hits” from a highly mined environment is promising and there is every reason for thinking this approach will adapt well to the less well-explored marine environment. So far, the approach is not selective—what grows and subsequently assayed. Enrichment culture, for example with poorly soluble polymers, would be one way to bias the method towards isolating microorganisms with a desired phenotype, such as polymer degradation. A variant of this diffusion chamber system that possesses

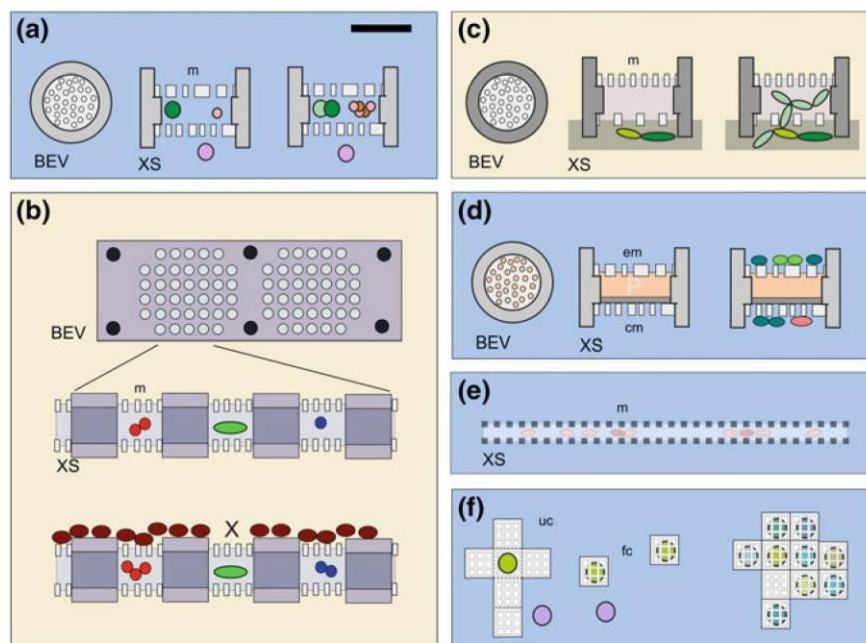


Fig. 15.3 Cultivation chambers for enrichment and near natural culture conditions. **a** In situ cultivation chamber filled with agar, then placed back in natural or simulated environment for cultivation of microorganisms in the interior. Scale bar (*top panel a*) indicates 1 cm for all panels. **b** iChip, an array of cultivation chambers similar to those in panel **a**. *Top* view of whole chip. *Middle* cross section showing microbial growth in compartments. *Bottom* Plating an indicator strain on the upper surface reveals antimicrobial activity from the bacteria contained within compartment X. **c** Selective, asymmetric capture chamber for mycelial organisms. BEV, Bird's Eye View. XS Cross section. The upper membrane (m) is a barrier for all microorganisms, the larger pore membrane can be penetrated by actinomycetes (represented by chains of green ovoids, growing from sediment) better than other bacteria, so tends to trap and enrich selectively. **d** Variant culture chamber with slowly degrading material (P, polymer) or microbial population in central chamber. Whilst bounded by two membranes, only the upper membrane (em, experimental membrane) communicates with inner chamber, the lower (cm, control membrane) does not. Therefore, the two microbial populations growing on the outer surfaces of em and cm can be expected to differ. **e** Porous tube containing bacteria (*light blue*) for exceptionally high surface area to volume ratio, allows recirculation of contents and extremely rapid exchange with the environment (*darker blue*). **f** Closing cage system of entrapment. *Left* part of this panel shows unfolded cage (uc) with a mesh hundreds of micrometers. *Center* cage now folded into a cube (fc) trapping a multicellular microbe or marine invertebrate. *Right* Assembly of multiple cages to create synthetic tissues or communities. The height in the XS of panels A, B and E is exaggerated circa two-fold to show detail. A *blue* background indicates marine use, a *beige* background that the main validation to date has been in the soil, but that the technology is applicable to the marine environment

selectivity uses asymmetric membranes (Fig. 15.3c). The upper membrane cannot be penetrated by microorganisms and the lower membrane has a pore size that enriches a particular group by selectively permitting growth into the chamber (Gavrish et al. 2008). When the pore size of the lower chamber is set to 0.45 μm ,

filamentous bacteria (particularly actinomycetes) showed an advantage in penetrating the chamber and could therefore be enriched and isolated. Precise modulation of pore size usefully excluded fungi and other microorganisms, which frequently overgrow actinomycetes in more conventional environmental screenings. Given that actinomycetes are major antibiotic producers but the number of new useful antibiotics is falling, selective entrapment of filamentous bacteria is a promising technique. If membranes can be fabricated that are selectively porous based on other properties (e.g., surface charge or hydrophobicity or surface molecules) this selective entrapment technique could become even more powerful.

Another variant of the culture chamber places the enrichment material in the central chamber and allows microorganisms to grow on the exterior of the membrane (Fig. 15.3d; MicroDish BV, unpublished). The advantage of this strategy is allowing a controlled experiment to take place. Most culturing chambers just trap what grows; they are a form of sampling rather than experimentation. In this scheme, microorganisms grow on the outer surface of a membrane exposed to the marine environment as well as the contents of an inner chamber (separated by a porous membrane, the inner chamber can contain nutrients or other microorganisms)—this acts as the experiment. A second membrane within the same chamber has equal exposure to the environment but no communication with the central chamber; this is the control. Therefore, a metagenomics experiment or targeted culturing approach should allow analysis of the differences in microorganism abundance (or nucleic acid sequence) between the experimental and control conditions. More complex geometries in culture chambers are possible, permitting multivariable experimentation *in situ*. An alternative format for porous enclosure is a hollow fiber (Fig. 15.3e), a tubular membrane which has an exceptionally high area in contact with the environment (Aoi et al. 2009). A porous polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (0.1 μm pores) contains the microorganisms of interest. This system shows a significant enhancement of culturability over agar-based methods, tested with three microbial populations derived from marine and industrial environments. Additionally, the total volume of the system can be increased (simply by extending the tubing), allowing rather larger populations of microorganisms to be enriched than is the case with micro-colony-based methods.

The diffusion chambers described above are sealed by hand under aseptic conditions and then placed in the environment. A particularly interesting development for the marine environment is the self-closing cultivation chamber (Fig. 15.3f), particularly if these could be closed in hard to reach environments, such as the deep-sea. One such approach is the creation of flat boxes that self-assemble (Leong et al. 2008). The sides to the box are all porous; when folded they form a cage. The assembled boxes can be sorted and are amenable to manipulation by magnetic fields. These properties offer the potential to stack boxes and therefore the creation of artificially structured communities of cells, again moving from sampling to experiments. Later developments have created self-folding structures, created purely from polymers that are optically transparent and capable of trapping microorganisms including eukaryotic cells (Azam et al. 2011).

15.8.2 Cultivation Chips

Starting with the Petri dish, there are a number of possible improvements that might be envisaged that would aid marine culturing. These include miniaturization, a greater potential for automation, the absence of gel polymers as a matrix (such as agar that may contain inhibitory compounds), and suitability for imaging or other detection methods. An early attempt at “the better Petri dish” is the hydrophobic grid membrane (HGM), a porous filter subdivided into hundreds of growth areas by wax barriers. HGM offers flexibility (can be placed on agar or non-agar surfaces and can be moved). The HGM has a greater dynamic range for counting colony-forming units compared to an equivalent area of agar (Sharpe and Michaud 1974). This is explained by a better segregation of colonies and effective statistics derived from the distribution of colonies segregated between a large number of compartments.

Microfabrication allows further subdivision of growth areas to the point where custom-built disposables with thousands of compartments are available (Incom, USA). Micro-engineering allows a series of configurations of what is effectively highly multiplexed multiwall plates. However, miniaturizing multiwall plates beyond a certain threshold creates problems as well as advantages. There may be issues of aeration (liquid trapped in capillaries cannot be shaken to introduce oxygen), imaging (hard to focus on cells in capillaries), assay sensitivity in low volumes and dehydration (nanoliter wells dry out unless the humidity is carefully controlled), cross contamination, and dependence on robotics that microbiology laboratories often lack. There are solutions and work-around possibilities for many of these issues. Simply optimizing geometry, shaking speed and angle, and media components within conventional multiwall plates can considerably help oxygenation (Duetz et al. 2000). Oxygen can be delivered to 96-well plates through an oxygen permeable membrane, leading to 96-well microtiter plates with oxygen transfer rates comparable to Erlenmeyer flasks (Microflask System, Applikon Biotechnology, NL). Additionally, the capillarity of micro- or nanoliter wells has been exploited to capture droplets in stackable microcapillary arrays.

Porous ceramics make a good basis for culture chips (Fig. 15.4), with the advantages of flatness, porosity, low autofluorescence, biocompatibility, and despite inertness, good ability to conjugate biomolecules (Ingham et al. 2007; Microdish BV, NL). The downside is brittleness of the ceramic, requiring reinforcement for good handling. Micro-engineering techniques can create micro-wells (7–300 μm across, 10–40 μm deep, fixed or variable geometries). Similar to culturing chambers, these can be used, in combination with sediments or other samples, to culture microorganisms that were refractory to culturing with conventional techniques. Additionally, the small volume of culture medium allows the use of high cost reagents or additives. Control of compartment size, combined with spacing allows fine-tuning of application. Furthermore, a common task in microbiology is the replication of microorganisms using a velvet pad (Lederberg and Lederberg 1952) or a simple printing device, such as a 96-pin array with a pin

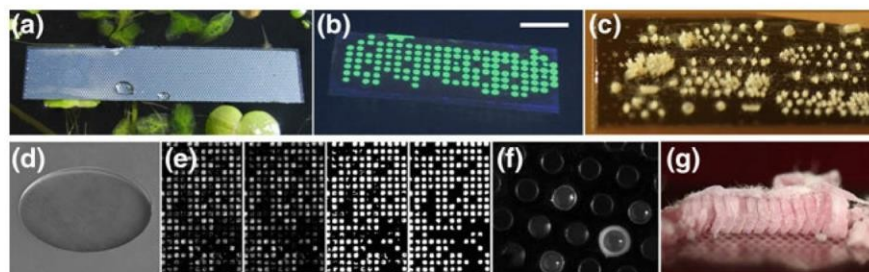


Fig. 15.4 MDCC. **a** Cultivation chip (MDCC180.10, 8 × 36 mm), floating on water, with PAO base and more than 4000 180-μm-diameter compartments in a hexagonal array coated with platinum. **b** Image of an array of 200-μm-diameter micro-colonies, visualized by green fluorescent protein and captured by a hand held digital camera. **c** Chip with variably spaced wells (MDCC180.10VAR) inoculated with fungi to look at the effect of colony density and size on growth. **d** Single 180-μm-diameter, 10-μm deep well. **e** Section of an MDCC20.10 chip with 20-μm² wells in an orthogonal array (125,000 wells per chip) used to culture bacteria, subsequently stained with a fluorescent dye and imaged by fluorescence microscopy. The four sections of this panel show how image processing moves the raw image from a gray scale photograph to a binary image—the final image used to score whether a compartment supports growth and therefore is scored as a CFU. **f** Image of a single colony from a screening of culture from arctic sediment. **g** Image of fungal mycelia growing out of 180-μm-diameter compartments as mycelial bundles. White scale bar (panel **b**) indicates 6 mm when applied to panel **a**, 1 mm for **b**, 2.5 mm for **c**, 40 μm for **d**, 150 μm for **e**, 420 μm for **f** and 800 μm when applied to **g**

spacing of ~0.5 mm. It is possible to deploy bacteria using non-contact printing devices; even ones modified from conventional inkjet printers (Flickinger et al. 2007). In terms of contact printing, miniaturized arrays of pins fabricated from elastopolymers allow a similar process but on a finer scale. A pin spacing of 80 μm is usable to replicate between micro-wells of a culture chip (Ingham et al. 2010).

Suspension cultivation is also possible in a highly multiplexed and miniaturized device. For example, arrays of microfluidic capillaries can sustain microbial growth using peristaltic pumps to move fluid and introduce oxygen (Gan et al. 2011). Moreover, micro-fabricated chips can be used to address questions such as to the organization of microbial communities (Keymer et al. 2006) or to approximate to the function of chemostats (Balagadde et al. 2005). We can expect further inventiveness in terms of microbial cultivation chips in the future (Lok 2015), and also hope that low cost manufacturing will make these devices affordable for the marine microbiologists. Therefore, these micro-fabricated chips will play a significant part in increasing the culturing members of the marine microbiome.

15.9 Single-Cell Techniques

In order to establish a pure culture, microbiologists have to isolate a viable cell and maintain its physical isolation whilst the cell divides to form a colony. Often, a pure culture is achieved by statistical means: either a sample is diluted until on average there is only a single viable cell left in the cultivation chamber, or cells are spread over a surface or in small volumes until on average there is a single isolated cell in a given location. Either way, when employing these methods there is little or no control over which individual cell in the original sample goes where. A fundamentally different approach involves the direct selective isolation of single cells from a sample, combined with a method for directing the cell to a known location, for example on an agar plate, a well in a multi-well plate, a micro-well, or micro-chamber in a microchip. Having isolated the cell and defined its position we can then alter its microenvironment to improve its culturability.

The isolation, handling, and analysis of single cells is nowadays a topic of growing interest because of the potential to target rare cells and obtain information on the heterogeneity of cultures (including gene expression) (Blainey 2013; Ishii et al. 2010; Stepanauskas 2012; Yun et al. 2013). A variety of techniques is either already available or under development to achieve this which will be discussed here. Many of the techniques were originally developed for use with mammalian cells, but could be or in some cases already have been adapted for use with marine microorganisms.

15.9.1 Cell Sorting

Sorting techniques can either be active or passive. Active systems generally use external fields (e.g. mechanical, acoustic, electric, magnetic, optical, hydrodynamic) to impose forces to displace cells, whereas passive systems use inertial forces, filters, and adhesion mechanisms to purify cell populations (Wyatt Shields IV et al. 2015). For the selective isolation of cells active sorting is generally preferred.

During the sorting process the cells can be dispersed in a static or moving fluid, or as single cells in micro-droplets or gel microbeads. To obtain a high throughput, the cells need to be suspended in a flow, sufficiently separated from each other to allow easy separation. The cells are then analyzed one at a time as they flow past a sensing system and then actively knocked out of the flow when the cell has the desirable properties. Throughput in static systems is generally lower, and the techniques used often put high demands on the dexterity of the operator. Automation is sometimes possible, for example, through the combined use of advanced control systems and robotics (Lu et al. 2010; Zhang et al. 2012), and can speed up the isolation process. However, flow-through systems can suffer from blockages.

15.9.2 Facs

The most well known technique used for flow-based cell sorting is the Fluorescence Activated Cell Sorter or FACS. Although traditionally mainly regarded as a tool for the analysis and sorting of large mammalian cells, the technique is increasingly used for microorganisms (Czechowska et al. 2008; Davey and Kell 1996; Mazard et al. 2014; Morono et al. 2013; Winson and Davey 2000). A typical FACS is shown in Fig. 15.5. It includes a stream containing the cells to be sorted, a device for hydrodynamic focusing this stream into a narrow laminar flow for cell analysis, a laser system that enables one to measure the fluorescent and light scattering properties of each single cell, a droplet generator system which produces droplets containing single cells, a method to place an electric charge on a droplet according to whether the cell is to be collected or not, and a method for selectively diverting droplets in an electric field. The droplets are sorted into tubes or wells of microtiter plates, although sorting microorganisms directly onto agar plates is also possible (Fig. 15.6). A standard FACS can achieve high cell throughputs ($>10^4$ cells/s), but large samples are needed, not all cells are fluorescent, it is difficult to isolate all individual cells in a sample, and it is often not possible to guarantee that the droplets contain single cells. A number of alternative cell sorters, many of them based upon miniaturization and making use of Microelectromechanical systems (MEMS) and Laboratory-on-a-Chip technologies, has been or is being developed in order to overcome these problems. Often their throughput of these miniaturized cell sorters is lower than FACS, enabling slower and more detailed cell analysis techniques such as image analysis or Raman spectroscopy to be used rather than fluorescence alone.

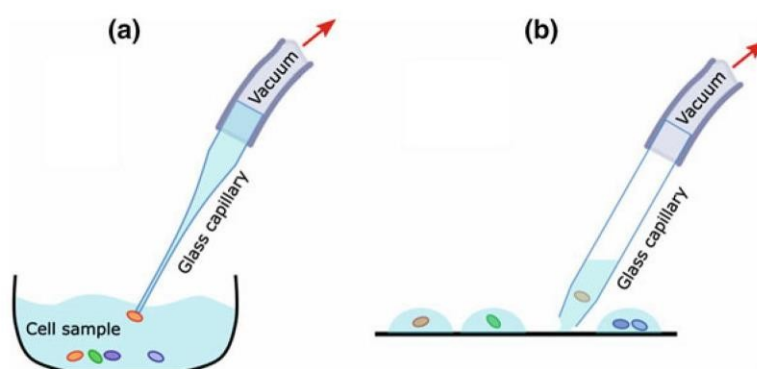


Fig. 15.5 Sketches of methods of isolation of cells with micropipettes. Cells can be isolated either by aspiration onto the tip of a narrow capillary (a), or into the body of the capillary itself (b). Aspiration onto the tip is more suitable for larger cells and filamentous organisms, but the risk of mechanical damage is greater

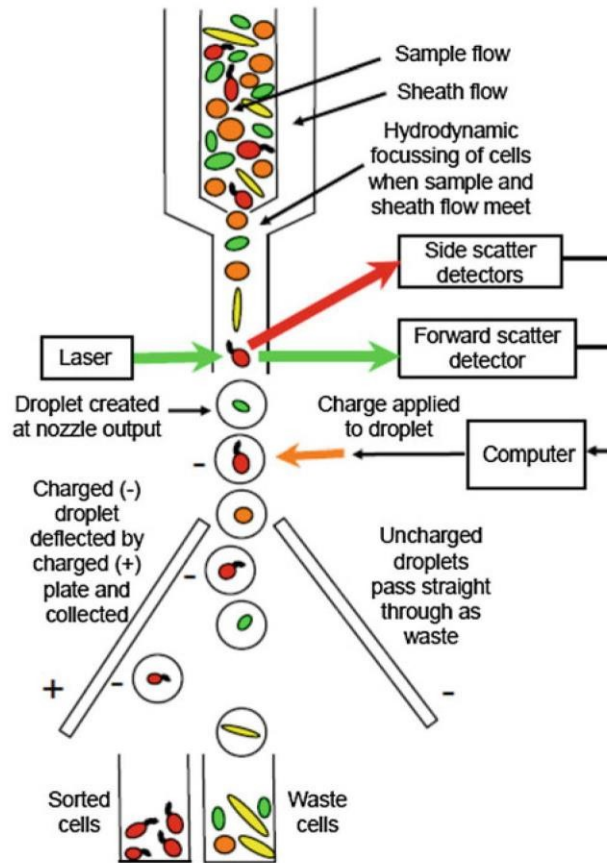


Fig. 15.6 Schematic of a fluorescence activated cell sorter (FACS). A FACS is made up of three main systems: fluidics, optics, and electronics. Fluidics: A sample of cells is hydrodynamically focused using a sheath flow. As cells flow along the stream of liquid, a laser scans them. Optics: Laser light scattered by the cell is collected by a detector such as a photo multiplier tube and is used to count cells and to measure the size and granularity of the cell. Laser light is also used to excite fluorescence from specifically labeled sub-populations of cells. Electronics: The light signals are converted into electronic signals and a computer processes the information to determine which cells are to be sorted. The electronics system controls the charging and deflection of particles. Droplets, each containing a single cell, are created at the output nozzle by vibrating the nozzle at an optimal frequency and an electrical charge (–) is applied to the droplets to be collected as they exit the nozzle. The charged droplet is then deflected left towards the positive electrode (+) into a collection tube. Droplets that contain no cells or cells that are not to be collected pass straight through into the waste tube. The collected population is a pure population for the criteria determined when setting up the experiment (for example cells with above a certain threshold of fluorescence emission)

These cell sorters include inkjet printer-based systems with integrated image analysis (Stumpf et al. 2015; Yusof et al. 2011), dielectrophoretic cell sorters (Hu et al. 2005; Zhang et al. 2015), optical force-based cell sorters (Enger et al. 2004; Keloth et al. 2015; Landenberger et al. 2012), and various valve-based microfluidic cell sorters fabricated with soft lithography (Fu et al. 2002; Robert et al. 2011).

15.9.3 Mechanical Micromanipulation Techniques

The use of mechanical micromanipulation techniques for the isolation of microbial cells has a long history, and reviews on early techniques have been given by Johnstone (1969, 1973), and more recently by Fröhlich and König (2000). Early techniques used micro-needles or microcapillaries for the isolation of microorganisms, but success was limited by the technology then available. The development of improved micromanipulators with accurate pneumatic or hydraulic pressure control systems and improved microscopy techniques have made the isolation of cells with these techniques much more straightforward, and many examples of the use of mechanical micromanipulators for the isolation of microbial cells can now be found in the literature (Fröhlich and König 1999; Ishøy et al. 2006). Either the entire cell is drawn into a micropipette that is much larger than the cell, or held at a pipette tip that has an opening that is smaller than the cell diameter (Lu et al. 2010) (Fig. 15.7). Microfabrication nowadays makes it possible to manipulate single cells with pressure force in a massively parallel way (Nagai et al. 2015), although pressure forces on mechanically isolated cells can be large, and can lead to damage to shear-sensitive cells.

An alternative approach to mechanical cell isolation using needles or pipettes involves the use of an externally applied physical field force to move the cells. Forces used for cell manipulation have been reviewed by Yun et al. (2013) and include optical, electric, magnetic and acoustic forces. To date acoustic forces have mainly lacked the resolution needed for single-cell manipulation. Most biological materials, including most cells, are diamagnetic and show little to no response to externally applied magnetic fields unless modified by the attachment of (super)-paramagnetic particles or suspended in a paramagnetic suspending fluid (Safarik and Safarikova 1999). The response of cells to electrical or optical forces is strong, however, and can be achieved without modification of the cells.

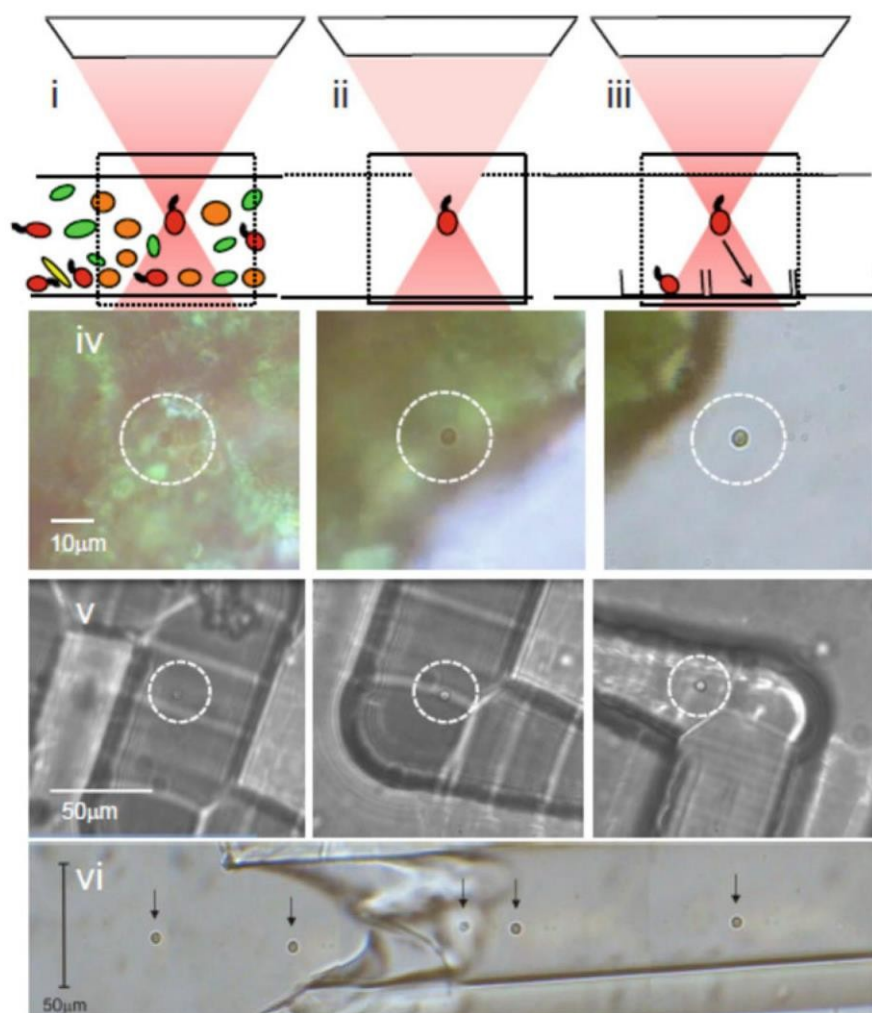


Fig. 15.7 Schematic of optical tweezing for cell isolation (*i*, *ii* and *iii*). Micrographs of optical tweezing (*iv* and *v*) and isolation (*vi*) of single cells. A tightly focused near infrared laser beam is used to trap and move a single cell in three dimensions away from surrounding cells, either in an environmental sample (schematic shown in *i*) or from a laboratory culture of cyanobacteria (*iv*). The selected cell is physically removed by optically tweezing the single cell away from the other cells via a narrow meandering channel (*ii* and *v*) to a region where there are no other contaminating cells, such as a culture chamber in a customized chip or a microcapillary (*iii* and *vi*). Cell selection and isolation can now be automated to decrease the burden on the operator. The isolated cell can be used to start a pure culture or can be joined in the chamber with a second, or any number of selected cells for co-culture

15.9.4 *Cell Manipulation with Electric Fields*

Cells can be moved by direct (DC) and alternating currents (AC); DC fields move cells through electrophoresis because cells have a net (negative) charge, and AC fields induce movement of the cells by the interaction between the induced dipole moment and electric field gradient (dielectrophoresis). Cell manipulation with high frequency (>10 kHz) AC fields is generally preferred over cell manipulation with DC fields as it suffers less from interference by local fluid streaming induced by the strong electric fields near the electrodes. Dielectrophoresis has been extensively used to create aggregates of microorganisms for the study of microbial interactions in biofilms, including metabolic interactions, quorum sensing, and resuscitation of dormant cells (Andrews et al. 2006; Mason et al. 2005; Zhu et al. 2010). However, to achieve the resolution needed for single-cell manipulation, structures are required of a size similar to that of a single cell. As a result, the manipulation of single cells with electric fields puts high demands on microfabrication skills. The electric field rapidly declines away from the electrode structures, and the electrode structures therefore have to be close to the cell to be isolated. Electric forces are strongly dependent on the composition of the medium, in particular its conductivity. The use of low salt media is often essential, although this can be to some extent alleviated using high frequency electric fields (Schnelle et al. 1999). Despite all this, various examples of single-cell manipulation and isolation with electric fields can be found in the literature (Graham et al. 2012; Hsiao et al. 2010; Schnelle et al. 1999; Yang et al. 2010; Zhang et al. 2015). On the whole, however, single-cell manipulation is simpler with optical techniques than with electrical techniques, and therefore preferable.

15.9.5 *Optical Manipulation*

Optical trapping of dielectric particles from tens of nanometers in diameter to tens of micrometers by a single-beam gradient force trap (also known as optical tweezers) (Ashkin et al. 1986; Ashkin and Dziedzic 1987) uses the phenomenon of optical force, or radiation pressure. A laser beam focused through a high numerical aperture objective lens is tightly focused and results in a three-dimensional gradient of laser intensity due to the Gaussian intensity profile of the laser in the transverse direction and the tight focusing in the longitudinal direction. A cell or any other microscopic, dielectric material with a refractive index greater than that of the surrounding medium will experience an optical pressure from transverse and longitudinal gradient forces that draws the cell towards the region of highest intensity—the laser beam focus. The scattering force also acts on the particle and the net effect can be stable trapping of the cell near the focal point. Optical tweezers are straightforward to implement, compatible with other microscopy techniques, and have been used to trap, position, and manipulate cells and molecules in a variety of experiments (Fig. 15.8). The wavelength of laser light can be selected to minimize photothermal

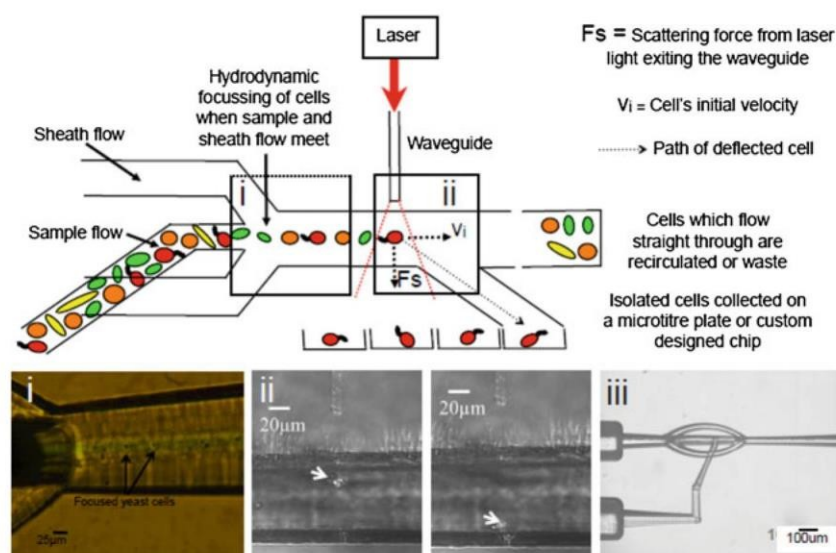


Fig. 15.8 Microfluidics with integrated optics for single-cell isolation. *Top* schematic of a working device created using ultrafast laser inscription and selective chemical etching and micrographs of the device. The cell sample is hydrodynamically focused using a sheath flow (*i*). The optical force from the laser beam emanating from the integrated waveguide deflects a single, selected cell (*ii*), which is collected from a side channel. The single isolated cell can be used to create a pure culture or other cells can be selected and deflected to create a co-culture. A micrograph of the device is shown in panel *iii*

and photochemical damage to cells (Haro-Gonzalez et al. 2013; Liang et al. 1996; Neuman et al. 1999). Cells are trapped at the focal point of a microscope objective lens, therefore working at a distance is possible, and as such experiments can be performed in enclosed, sterile sample chambers. There is no mechanical contact that can introduce risk of contamination, and subcellular organelles or endophytes can be manipulated within the cell by focusing the laser beam through the membrane (Sacconi et al. 2005). In addition, optical tweezers provide the ability to accurately measure small forces in biology, down to the level of piconewtons (Block et al. 1989).

Optical tweezers have been used for cell sorting (Ericsson et al. 2000) to select single cells and position them in patterns on a microscope slide, immobilize them, and study their viability. There have been several studies reported in the literature on the development of automated optical tweezers for manipulating and precise positioning of microspheres (Banerjee et al. 2010; Ozcan et al. 2006), diatoms (Tanaka et al. 2008), and eukaryotic cells (Grover et al. 2001; Hu and Sun 2011; Wang et al. 2013). In addition to using a tightly focused beam, laser light can be loosely focused, collimated or diverging and can exert a guiding force on a cell to push it in the direction of beam propagation (Arlt et al. 2001; Ashkin et al. 1970; Imasaka et al. 1995).

A novel, microfluidic device with integrated channels and waveguides fabricated using ultrafast laser inscription combined with selective chemical etching (Choudhury et al. 2014) is being developed in order to enable sorting and isolation of biological cells using the optical force of laser light (Fig. 15.8). The complex three-dimensional microfluidic structures within the device allow the injected cell population to focus in a hydrodynamic flow (Keloth et al. 2015; Paie et al. 2014). Continuous wave laser in the near infrared light is coupled into the integrated waveguide in the device. The laser light emerges from the waveguide into the microfluidic channel and is used to exert radiation pressure on the selected cells (Keloth et al. 2015) as these cells in the focused stream flow past the waveguide. The optical scattering force then pushes the cell from the focused stream into the sheath fluid. Thus, individual cells can be controllably deflected from the focused flow to the side channel for downstream analysis or culture.

15.9.6 Single-Cell Culture and Modification of Its Microenvironment

A large variety of methods has been or is currently under development for culture of single cells. In many cases, the work is done not with cells from the marine environment but with model organisms such as *Escherichia coli* that are easy to culture and readily modified. However, the work described can often translate well to working with (marine) uncultured microorganisms. Working with natural or artificial seawater is in itself not usually an issue when working in miniaturization; the most common materials used such as the photoresist SU8 and the polymer PDMS are highly biocompatible and resistant to seawater. The long incubation times can be an issue as dehydration is a recurrent danger when working with small volumes but can be controlled by ensuring samples remain well isolated and humidity levels are controlled. Also, PDMS is a material that is highly permeable to small molecules.

Prominent amongst single-cell culture methods are those based on micro-droplet formation in microfluidic devices (Eun et al. 2011; Joensson and Andersson Svahn 2012; Liu et al. 2009; Pan et al. 2011). Typically a stream of suspended cells is introduced into a stream on a non-miscible biocompatible fluid such as a mineral or vegetable oil or a fluorocarbon carrier fluid. Droplet formation is controlled by the interaction between hydrodynamic and interfacial forces, although electric fields may also be used to control the timing of droplet formation and droplet size (Link et al. 2006). An alternative is the formation of arrays of individual droplets by interfacial effects, for example at micro-wells in an SU8 surface (Boedicker et al. 2009). Although in each case, whether you have a single cell in a droplet or not is mainly determined by chance. The technique has great merit because it facilitates high-throughput experimentation and also automation is straightforward (Khorshidi et al., 2014). Of particular interest for the study of uncultured microorganisms is

also the chemistode, which allows sampling and formation of nanoliter volume droplets directly from the environment (Liu et al. 2009). Droplet microfluidics has allowed the investigation of the effect of cell number (Boedicker et al. 2009) on cell growth and quorum sensing responses. Confining a cell to a(n) (insulated) micro-droplet is essentially equivalent to increasing the cell density more than a thousand fold compared to having a cell in a Petri dish (Boedicker et al. 2009; Vincent et al. 2010). As a result, when confining cells to micro-droplets, Boedicker et al. (2009) found that the single cells confined in micro-droplets were able to induce a quorum sensing response. This raises the question whether quorum sensing actually is a community response. Such confinement of microorganisms to micro-droplets or micro-chambers, which have no mechanism of exchange of signaling molecules, could help inducing growth of uncultured microorganisms (Ma et al. 2014; Vincent et al. 2010). At the same time, if there is exchange, then it can be fast due the high surface to volume ratio of devices at the microscale (Boitard et al. 2015). This could be used to advantage, for example, to more effectively remove accumulated toxins.

Miniaturized methods that use compartmentalization can eliminate competition among species (Ma et al. 2014). However, as interactions between microorganisms are thought to be an important factor for cell culturability, the ability to control interactions between cells is highly attractive. A micro-droplet-based example is that developed by Park et al. (2011) for parallel co-culture of cells. Kim et al. (2008) developed a system of interconnected micro-chambers in which three of them are located close to each other but communication could only occur by diffusion. When Kim et al. (2008) constructed a community of three different species of wild-type soil bacteria with syntrophic interactions using this device they found that the spatial separation of the different species was essential for the community to survive: if the cells mixed then competition between the different species would cause the community to collapse.

The micromanipulation techniques described in the previous part of this chapter allowed one to select cells from a mixture rather than leaving the choice of cells to be investigated by chance. Yasuda et al. (Umehara et al. 2003; Wakamoto et al. 2003; Yasuda et al. 2013) have taken this approach further and used laser tweezers to move single cells of *E. coli* into individual chambers in a micro-chamber array (Wakamoto et al. 2003). After a cell had divided, the authors moved one of the two daughter cells to a vacant chamber, allowing differences between generations to be studied. In later sets of experiments, the same group also developed methods for observing the adaptation of single cells, tweezed into individual micro-chambers, to changes in nutrient concentrations (Umehara et al. 2003). The ability to change the response of cells to changes in nutrient concentration is also important for studies of culturability. Also of interest is therefore the work by Eriksson et al. (2007) who used optical tweezers to move single (yeast) cells in a gradient created within a microfluidic device, thus exposing cells to different environments and allowing the detection and analysis of rapid changes.

15.10 Conclusion

For a long time, microbes by observing changes in a spectrophotometer. Low ATPmetry, and microp with a low threshold accustomed to working sensitivity of molecular and allows one to obtain and sequencing. More sequenced in order to i artificial media best sui

The dilution-to-extir expected to become a w in order to isolate rele biomass detection meth the isolation of key m brought into culture wi high cell numbers in conditions, there gener mation that may later c

Culture chips and in promising, because they study of syntrophic rel such culture chip metho medium” with advantag of miniaturized culture micro-colonies, recover molecular techniques.

Single-cell approach optical tweezers), whic Optical tweezers, and o a mixture, to isolate it

The marine environ greatest biodiversity on The recent progress in marine microorganisms ria, that have been fou

Acknowledgments The re-Union Seventh Framework publication reflects the vi responsible for any use whi Jochen Schuster and Anu: illustrations. Research was

References

- Akselband Y, Cabral C, slow-growing marine m assay and fluorescence-
Andrews JS, Mason VP, artificially structured mi interactions via metabo 64(1):96–106
Aoi Y, Kinoshita T, Hata chamber as a device 75(11):3826–3833
Arlt J, Garces-Chavez V, Si light beam. Optics Com
Ashkin A (1970) Accelerat 24:156–159
Ashkin A, Dziedzic JM (19 235(4795):1517–1520
Ashkin A, Dziedzic JM, Bj optical trap for dielectri
Azam A, Laflin K, Jama polymeric containers. B
Balagadde FK, You LC, Hai undergoing programmed
Banerjee AG, Pomerance programming framework IEEE Trans Autom Sci
Ben-Dov E, Kramarsky-V microorganisms using a
Blainey PC (2013) The fi Microbiol Rev 37(3):40
Block SM, Blair DF, Berg tweezers. Nature 338(6:
Boedicker JQ, Vincent M bacteria in small volum reveals its variability. A
Boitard L, Cottinet D, Brei droplets. Eng Life Sci J
Bustard MT, Burgess JG hyperthermophiles in e Biotechnol 75:1095–110
Button DK, Schut F, Qua marine-bacteria by dilu Microbiol 59(3):881–89

15 New Approaches for 1

- Button DK, Robertson I
high-affinity, novel bac
compatible with growth
Environ Microbiol 64(1
Cachon R, Lacroix C, Divie
lactis sp. using both sim
Carini P, Steindler L, Besz
extreme oligotroph ‘C
ISME J 7(3):592–602
Carini P, Campbell EO, M
Begley T, Giovannoni
pyrimidine precursor an
Cassidy MB, Lee H, Trev
cells: a review. J Ind M
Cho JC, Giovannoni SJ (C
oligotrophic marine Ga
Choudhury D, Macdonald
integrated applications.
Connon SA, Giovannoni S
very-low-nutrient medi
(8):3878–3885
Czechowska K, Johnson J
single-cell analysis in e
Davey HM, Kell DB (19
populations: the import
Doleyres Y, Fliss I, Lacroi
Lactococcus lactis proc
J Appl Microbiol 97(3)
D’Souza SF (2002) Tren
1:321–338
Duetz WA, Ruedi L, Hern
aeration, growth, storag
Microbiol 66(6):2641–2
Enger J, Goksor M, Rams
microfluidic system. La
Ericsson M, Hanstorp D, E
with optical tweezers. J
Eriksson E, Enger J, Nordl
Hanstorp D (2007) A n
rapid and reversible cy
Chip 7(1):71–76
Eun Y-J, Utada AS, Cope
agarose microparticles u
Chem Biol 6(3):260–26
Ferrari BC, Winsley T, G
bacteria using a soil sul
Flickinger MC, Schottel JL
bacteria: engineering n
intensify reactivity. Bio
Fröhlich J, König H (199
laboratory populations v
Fröhlich J, König H (200
Microbiol Rev 24(5):56

- Fu AY, Chou HP, Spence C, Arnold FH, Quake SR (2002) An integrated microfabricated cell sorter. *Anal Chem* 74(11):2451–2457
- Futra D, Heng LY, Surif S, Ahmad A, Ling TL (2014) Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters. *Sensors (Basel)* 14(12):23248–23268
- Gan M, Su J, Wang J, Wu H, Chen L (2011) A scalable microfluidic chip for bacterial suspension culture. *Lab Chip* 11(23):4087–4092. doi:10.1039/c1lc20670b
- Gavriš E, Bollmann A, Epstein S, Lewis K (2008) A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria. *J Microbiol Methods* 72(3):257–262
- Giebel H-A, Kalhoefer D, Gahl-Janssen R, Choo Y-J, Lee K, Cho J-C, Tindall BJ, Rhiel E, Beardsley C, Aydogmus O, Voget S, Daniel R, Simon M, Brinkhoff T (2013) *Planktomarina temperata* gen. nov., sp. nov., belonging to the globally distributed RCA cluster of the marine *Roseobacter* clade, isolated from the German Wadden Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 63(Pt 11):4207–4217
- Giovannoni SJ, Tripp HJ, Givan S, Podar M, Vergin KL, Baptista D, Bibbs L, Eads J, Richardson TH, Noordewier M, Rappé MS, Short JM, Carrington JC, Mathur EJ (2005) Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* 309(5738):1242–1245
- Gorlas A, Alain K, Bienvenu N, Geslin C (2013) *Thermococcus prieurii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2920–2926
- Graham DM, Messerli MA, Pethig R (2012) Spatial manipulation of cells and organelles using single electrode dielectrophoresis. *Biotechniques* 52(1):39–43
- Grover SC, Skirtach AG, Gauthier RC, Grover CP (2001) Automated single-cell sorting system based on optical trapping. *J Biomed Opt* 6(1):14–22
- Hahnke RL, Bennke CM, Fuchs BM, Mann AJ, Rhiel E, Teeling H, Amann R, Harder J (2015) Dilution cultivation of marine heterotrophic bacteria abundant after a spring phytoplankton bloom in the North Sea. *Environ Microbiol* 17:3515–3526
- Haro-Gonzalez P, Ramsay WT, Martinez Maestro L, del Rosal B, Santacruz-Gomez K, del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Sanz-Rodriguez F, Chooi JY, Rodriguez Sevilla P, Bettinelli M, Choudhury D, Kar AK, Garcia Sole J, Jaque D, Paterson L (2013) Quantum dot-based thermal spectroscopy and imaging of optically trapped microspheres and single cells. *Small* 9(12):2162–2170
- Hsiao AP, Barbee KD, Huang X (2010) Microfluidic device for capture and isolation of single cells. In: *Biosensing III* 7759
- Hu S, Sun D (2011) Automatic transportation of biological cells with a robot-tweezer manipulation system. *Int J Robot Res* 30(14):1681–1694
- Hu XY, Bessette PH, Qian JR, Meinhart CD, Daugherty PS, Soh HT (2005) Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(44):15757–15761
- Imasaka T, Kawabata Y, Kaneta T, Ishidzu Y (1995) OPTICAL CHROMATOGRAPHY. *Anal Chem* 67:1763–1765
- Ingham CJ, van Hylckama JET (2008) MEMS and the microbe. *Lab Chip* 8(10):1604–1616
- Ingham CJ, Sprengels A, Bomer J, Molenaar D, van den Berg A, van Hylckama Vlieg JET, de Vos WM (2007) The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* 104(46):18217–18222
- Ingham C, Bomer J, Sprengels A, van den Berg A, de Vos W, van Hylckama Vlieg J (2010) High-resolution microcontact printing and transfer of massive arrays of microorganisms on planar and compartmentalized nanoporous aluminium oxide. *Lab Chip* 10(11):1410–1416
- Ishii S, Tago K, Senoo K (2010) Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(5):1281–1292
- Ishoy T, Kvist T, Westermann P, Ahring B (2006) An improved method for single cell isolation of prokaryotes from meso-, thermo- and hyperthermophilic environments using micromanipulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(5):510–514
- Joensson HN, Andersson Svahn H (2012) Droplet microfluidics—a tool for single-cell analysis. *Angew Chem Int Ed* 51(49):12176–12192

15 New Approaches for 1

- John RP, Tyagi RD, Brar S
cells for targeted agricu
- Johnstone KI (1969) The is
(eds) Methods in micro
- Johnstone KI (1973) Micro
the agar gel dissection t
- Joint I, Muehling M, Querc
biodiscovery. Microb B
- Kaeberlein T, Lewis K, Eps
in a simulated natural e
- Kanasawud P, Hjiirleifsdot
thermophilic bacterium
Microbiol Biotechnol 3
- Keloth A, Paterson L, Ma
isolating microbes. In: 1
- Keymer JE, Galajda P, M
nanofabricated landscap
- Khorshidi MA, Rajeswari F
analysis of dynamic bel
- Kim HJ, Boedicker JQ, C
synthetic multispecies b
- Klingeberg M, Vorlop KI
bacteria for the produc
Microbiol Biotechnol 3
- Konneke M, Bernhard A, c
autotrophic ammonia-o
- Kopf A, Bicak M, Kottma
Jeanthon C, Rahav E, U
Abdallah RZ, Sonnensc
Duarte B, Cacador I, Ca
Luna GM, Quero GM
LaRoche J, Penna A, F
Jude-Lemeilleur F, Agu
Conan P, Alonso C, St
Kamp J, Frampton DN
Mortelmans J, Pitois S,
Biancalana F, Santana
Rodriguez-Ezpeleta N,
Ghazal H, Chaouni E
Chahboune R, Barrijal
Karamfilov V, Ten Ho
Martin P, Jensen RM,
Santos A, Villar E, Pes
Turk V, Tinta T, Fulle
Nyhus PAF, Bente E, F
Johnson Z, Sinigallian
Costa AC, El Bour M,
Amaral-Zettler LA, Gill
day consortium. GigaSc
- Kourkoutas Y, Bekatorou
technologies and suppo
Microbiol 21(4):377–39
- Landenberger B, Hoefema
cells with dynamic opti

- Lederberg J, Lederberg EM (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol* 63(3):399–406
- Leong TG, Randall CL, Benson BR, Zarafshar AM, Gracias DH (2008) Self-loading lithographically structured microcontainers: 3D patterned, mobile microwells. *Lab Chip* 8(10):1621–1624
- Liang H, Vu KT, Krishnan P, Trang TC, Shin D, Kimel S, Berns MW (1996) Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping. *Biophys J* 70(3):1529–1533
- Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schaberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millett WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen C, Lewis K (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517(7535):455–459
- Link DR, Grasland-Mongrain E, Duri A, Sarrazin F, Cheng ZD, Cristobal G, Marquez M, Weitz DA (2006) Electric control of droplets in microfluidic devices. *Angewandte Chemie-Int Edn* 45(16):2556–2560
- Liu W, Kim HJ, Lucchetta EM, Du W, Ismagilov RF (2009) Isolation, incubation, and parallel functional testing and identification by FISH of rare microbial single-copy cells from multi-species mixtures using the combination of chemistode and stochastic confinement. *Lab Chip* 9(15):2153–2162
- Lok C (2015) Mining the microbial dark matter. *Nature* 522(7556):270–273
- Lu Z, Moraes C, Ye G, Simmons CA, Sun Y (2010) Single cell deposition and patterning with a robotic system. *PLoS ONE* 5(10):e13542
- Ma L, Datta SS, Karymov MA, Pan Q, Begolo S, Ismagilov RF (2014) Individually addressable arrays of replica microbial cultures enabled by splitting SlipChips. *Integr Biol* 6(8):796–805
- Martens-Habbena W, Sass H (2006) Sensitive determination of microbial growth by nucleic acid staining in aqueous suspension. *Appl Environ Microbiol* 72(1):87–95. doi:10.1128/aem.72.1.87-95.2006
- Mason VP, Markx GH, Thompson IP, Andrews JS, Manefield M (2005) Colonial architecture in mixed species assemblages affects AHL mediated gene expression. *FEMS Microbiol Lett* 244(1):121–127
- Mazard S, Ostrowski M, Holland R, Zubkov MV, Scanlan DJ (2014) Targeted genomics of flow cytometrically sorted cultured and uncultured microbial groups. *Methods Mol Biol* (Clifton, NJ) 1096:203–212
- Morono Y, Terada T, Kallmeyer J, Inagaki F (2013) An improved cell separation technique for marine subsurface sediments: applications for high-throughput analysis using flow cytometry and cell sorting. *Environ Microbiol* 15(10):2841–2849
- Nagai M, Oohara K, Kato K, Kawashima T, Shibata T (2015) Development and characterization of hollow microprobe array as a potential tool for versatile and massively parallel manipulation of single cells. *Biomed Microdevices* 17(2). doi:10.1007/s10544-015-9943-z
- Neuman KC, Chadd EH, Liou GF, Bergman K, Block SM (1999) Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps. *Biophys J* 77(5):2856–2863
- Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, Kanigan T, Lewis K, Epstein SS (2010) Use of icip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl Environ Microbiol* 76(8):2445–2450
- Norton S, Lacroix C (2000) Gellan gum gel as entrapment matrix for high temperature fermentation processes: a rheological study. *Biotechnol Tech* 4(5):351–356
- Nussinovitch A (2010) Bead formation, strengthening, and modification. *Polymer macro- and micro-gel beads: fundamentals and applications*. Springer, New York, pp 27–52
- Ozcan M, Onal C, Akatay A (2006) A compact, automated and long working distance optical tweezer system. *J Mod Opt* 53(3):357–364
- Paie P, Bragheri F, Vazquez RM, Osellame R (2014) Straightforward 3D hydrodynamic focusing in femtosecond laser fabricated microfluidic channels. *Lab Chip* 14(11):1826–1833
- Pan J, Stephenson AL, Kazamia E, Huck WTS, Dennis JS, Smith AG, Abell C (2011) Quantitative tracking of the growth of individual algal cells in microdroplet compartments. *Integrative Biology* 3(10):1043–1051

15 New Approaches for 1

- Park J, Kerner A, Burns M
of microbial communiti
Rappe MS, Cannon SA, V
marine bacterioplankton
Rathore S, Desai PM, Liev
cells. *J Food Eng* 116(2
Robert D, Pamme N, Conje
capacity in a microfluid
Roy D (2015) Novel bior
handbook of marine bic
Rusch DB, Halpern AL, St
Hoffman JM, Remingt
Thorpe J, Freeman J, .
Utterback T, Rogers Y
Sathyendranath S, Plat
Strausberg RL, Nealsor
ocean sampling expedi
5(3):398–431
- Sacconi L, Tolic-Norrelykl
nipulations inside yeast
Safarik I, Safarikova M
J Chromatogr B 722(1–
Schnelle T, Muller T, J
dielectrophoretic tweeze
Biophysica Acta-Gen S
Schut F, Devries EJ, Gottsch
of typical marine-bacteri
isolates under laboratory
Sharpe AN, Michaud G
microbiological enumer
Song J, Oh H-M, Cho J-C (C
culturing from the East
Staley JT, Konopka A
microorganisms in aqua
Stepanauskas R (2012) *Sing*
15(5):613–620
- Stingl U, Tripp HJ, Giova
novel SAR11 strains a
Bermuda Atlantic Time
Stumpf F, Schoendube J, C
PCR of genomic DNA
Bioelectron 69:301–306
- Tanaka Y, Kawada H, Hir
non-spherical micro-ot
techniques. *Opt Express*
Tanaka T, Kawasaki K,
Nakatsu CH, Kamagata
microorganism cultivab
Tripp HJ, Kitner JB, Schw
marine bacteria require
Umehara S, Wakamoto Y,
for monitoring environ
305(3):534–540

- Vancanneyt M, Schut F, S
alaskensis sp nov., a dc
Evol Microbiol 51:73–8
- Venter J, Remington K, He
Nelson W (2004) Envi
304:66–74
- Vincent ME, Liu W, Ha
enhances analysis of ra
control of diffusible sig
- Wakamoto Y, Umehara
non-destructive, non-co
tivation and optical twe
- Wang X, Gou X, Chen S, ?
array and optical twee
23(7):075006
- Watve M, Shejval V, Sonav
Champhenkar A, Dam
oligophilic bacteria: A l
- Weibel DB, DiLuzio WR, ?
Microbiol 5(3):209–218
- Winson MK, Davey HM (2
Method Enzymol 21(3)
- Wyatt Shields Iv C, Reyes C
in the separation of cell
- Yang S-M, Yu T-M, Huan
patterning of microparti
Opt Lett 35(12):1959–1
- Yasuda K, Hattori A, Kim
Non-destructive on-chip
Nanofluid 14(6):907–93
- Yun H, Kim K, Lee WG C
Yusof A, Keegan H, Spill
(2011) Inkjet-like printi
- Zengler K, Toledo G, Rapp
uncultured. Proc Natl A
- Zengler K, Walcher M, C
Short JM, Keller M (20
sules. Methods Enzyme
- Zhang X, Leung C, Lu Z
positioning of biological
- Zhang P, Ren L, Zhang X
Raman-activated cell so
87(4):2282–2289
- Zhu K, Kaprelyants AS
dielectrophoresis of n
Biomicrofluidics 4(2):0

Annexe 2 : Préparation des solutions de lyse et dénaturantes.

Tampons à préparer sous hotte stérile. Filtrer les tampons à 0,2µm et aliquoter aux volumes souhaités, selon l'utilisation de chacun.

Tampon de lyse (Vf = 10mL)

	Concentration S° mère	Volume S° mère	Concentration S° fille
KOH	1M	4 mL	400 mM
EDTA	0,5 M	200 µL	10 mM
DTT	1M	1 mL	100 mM
Eau Milli Q		Qsp 10 mL (≈ 4,8 mL)	

KOH 1M (1L, Sigma, Réf 35113, stockage à TA)

EDTA 0,5 mM pH 8,0 (stockage à TA)

DTT 1M (10mL, Sigma, Réf 43816, stockage à +4°C)

Tampon de neutralisation (Vf = 10mL)

	Concentration S°mère	Volume S° mère	Concentration S° fille
HCl	12M	330 µL	400 mM
Tris-HCl pH7,5	1M	6 mL	600 mM
Eau Milli Q		Qsp 10 mL (≈ 3,670 mL)	

HCl 12M (100mL, Sigma, Réf H1758, stockage à TA)

Tris-HCl pH 7,5 (1M, Life technologies (Invitrogen™ Ultrapure™), Réf 15567-027, stockage à TA)

Annexe 3 : Table de Mac Crady

Table pour 2 tubes par dilution	
Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0
001	0.5
010	0.5
011	0.9
020	0.9
100	0.6
101	1.2
110	1.3
111	2.0
120	2.0
121	3.0
200	2.5
201	5.0
210	6.0
211	13.0
212	20.0
220	25.0
221	70.0
222	110.0

Annexe 4 : Préparation des solutions dénaturantes pour la DGGE.

Composition des solutions dénaturantes utilisées pour réaliser les gels DGGE à 8 % d'acrylamide (v/v).

<i>Solutions</i>	% dénaturant						
	0	20	30	40	60	70	80
Acrylamide/Bis (37,5 :1) 40% (BioRad), en mL	20	20	20	20	20	20	20
TAE 50X (BioRad), en mL	2	2	2	2	2	2	2
Formamide désionisé (Sigma), en mL	0	8	12	16	24	28	32
Urée (BioRad), en g	0	8,4	12,6	16,8	25,2	29,4	33,6
Eau MilliQ	qsp 100 mL						

Annexe 5: Présentation de l'article (La Cono et al., 2011) avec les résultats des approches culturelles.



Unveiling microbial life in new deep-sea hypersaline Lake *Thetis*. Part I: Prokaryotes and environmental settings

Violetta La Cono,¹ Francesco Smedile,¹ Giovanni Bortoluzzi,² Erika Arcadi,¹ Giovanna Maimone,¹ Enzo Messina,¹ Mireno Borghini,³ Elvira Oliveri,⁴ Salvatore Mazzola,⁵ Stephan L'Haridon,⁶ Laurent Toffin,⁶ Lucrezia Genovese,¹ Manuel Ferrer,⁷ Laura Giuliano,^{1,8} Peter N. Golyshin⁹ and Michail M. Yakimov^{1*}

¹Institute for Coastal Marine Environment, CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122 Messina, Italy.

²Institute for Marine Sciences, ISMAR-CNR, Forte S. Teresa, 19136 Pozzuolo di Lerici, La Spezia, Italy.

³Institute for Marine Sciences, ISMAR-CNR, Via Gobetti 101, 40129 Bologna, Italy.

⁴Institute for Coastal Marine Environment, CNR, Via Del Mare 3, 91021 Torretta Granitola, Italy.

⁵Institute for Coastal Marine Environment, CNR, Calata Porta di Massa, 80133 Napoli, Italy.

⁶Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (UMR6197) IFREMER Centre de Brest, Technopôle Brest-Iroise, BP70, 29280 Plouzané, France.

⁷Institute of Catalysis, CSIC, Marie Curie 2, 28049 Madrid, Spain.

⁸Mediterranean Science Commission (CIESM), 16 bd de Suisse, MC 98000, Monaco.

⁹School of Biological Sciences, Bangor University, ECW Bldg Deiniol Road, Bangor, Gwynedd LL57 2UW, UK.

Summary

In September 2008, an expedition of the RV *Urania* was devoted to exploration of the genomic richness of deep hypersaline anoxic lakes (DHALs) located in the Western part of the Mediterranean Ridge. Approximately 40 nautical miles SE from *Urania* Lake, the presence of anoxic hypersaline lake, which we named *Thetis*, was confirmed by swath bathymetry profiling and through immediate sampling casts. The brine surface of the *Thetis* Lake is located at a depth of

3258 m with a thickness of ~157 m. Brine composition was found to be thalassohaline, saturated by NaCl with a total salinity of 348‰, which is one of highest value reported for DHALs. Similarly to other Mediterranean DHALs, seawater-brine interface of *Thetis* represents a steep pycno- and chemocline with gradients of salinity, electron donors and acceptors and possesses a remarkable stratification of prokaryotic communities, observed to be more metabolically active in the upper interface where redox gradient was sharper. [¹⁴C]-bicarbonate fixation analysis revealed that microbial communities are sustained by sulfur-oxidizing chemolithoautotrophic primary producers that thrive within upper interface. Besides microaerophilic autotrophy, heterotrophic sulfate reduction, methanogenesis and anaerobic methane oxidation are likely the predominant processes driving the ecosystem of *Thetis* Lake.

Introduction

The first finding in Eastern Mediterranean Sea of deep depressions filled by NaCl-saturated brines (Tyro and Bannock brine lakes) is dated by 1983–1984 (Jongsma *et al.*, 1983; Cita *et al.*, 1985). In 1994–1995 in a very limited area located in the Eastern part of the Mediterranean Ridge and called 'Medriff corridor', *Urania*, *L'Atalante* and *Discovery* brine lakes were discovered in three research cruises and were correspondingly titled after the names of three research vessels that performed these cruises (Medriff Consortium, 1995). After discovery of these brine lakes, Medriff Consortium (1995) speculated about the existence of further of deep hypersaline anoxic lakes (DHALs) in this area. All these Eastern Mediterranean Sea deep-sea hypersaline anoxic lakes were likely formed during strong tectonic events by submarine dissolution of outcropping Messinian evaporites followed by accumulation of high-density brines at the bottom of collapsed basins. Second possibility is a tectonically driven expulsion on the seabed of large quantities of interstitial evaporated seawater present in sub-bottom evaporite deposits (Vengosh and Starinsky, 1993; Cita, 2006; CIESM, 2008). Whatever the case, the brines of DHALs originated from dissolution of 5.9- to 5.3-million-

Received 24 November, 2010; accepted 28 February, 2011. *For correspondence. E-mail: michail.yakimov@iamc.cnr.it; Tel. (+39) (090) 669 003; Fax (+39) (090) 669 007.

© 2011 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd

year-old Messinian evaporites, within Mediterranean sediments at low (Cita, 2006). The chemistry of the DHALs is highly variable and suggests dissolution levels of the Messinian evaporitic levels (Cita, 1990; Cita, 2006). Thus, most of the DHALs are thalassohaline (seawater major ions) with total salinity 7–10 ‰ of the seawater. Among Mediterranean DHALs, *Discovery Lake* is filled almost exclusively with seawater and it is therefore one of the salt water bodies recorded in natural environments (Cita, 1997).

Because of a contrast in densities, DHALs are separated from the overlying seawater by a sharp (less than 2 m thick) interface to be the hot spot for biological activity, including lithoautotrophy (Daffonchio *et al.*, 2007a). In our previous studies, Mediterranean DHALs, in spite of being the best ecosystems on Earth, are inhabited by prokaryotic and microeukaryotic communities only distantly similar to those from hypersaline anoxic sediments (Cita, 1997; Alexander *et al.*, 2009; Borin *et al.*, 2009). In these halophilic prokaryotes, these microorganisms contain the organisms distantly related to the known genetic clades. Groups formed by the named ‘MSBL (Mediterranean Sea Brine Lake) divisions’ (van der Wielen *et al.*, 2006) of such deep-branching MSBLs were observed in Mediterranean DHALs (Cita, 1997; Borin *et al.*, 2009).

In this study we present the results of a geochemical and microbiological analysis of the thalassohaline DHAL located SE of the Messinian Sea, which we named after the CNR research vessel that was sunk on the 3rd of August 1992 (the *Deep*) exists at the seabed of Reggio Calabria. This lake does not contain brine (Pierret *et al.*, 2007a) and its chemistry of novel lake was found to be different from that of previously studied *L'Atalante* (Daffonchio *et al.*, 2007a). The vertical distribution of microbial groups was investigated in relation to the local environment in order to understand the importance of important metabolic pathways: sulfur oxidation, sulfate reduction, anaerobic oxidation of methane. A fingerprinting, 16S rRNA and functional gene library analyses, autotrophic activity, and cultivation, the *Thetis* prokaryotic community in this highly stratified and metabolically rich environment at the interface compared with the overlaying seawater.

© 2011 Society for Applied Microbiology

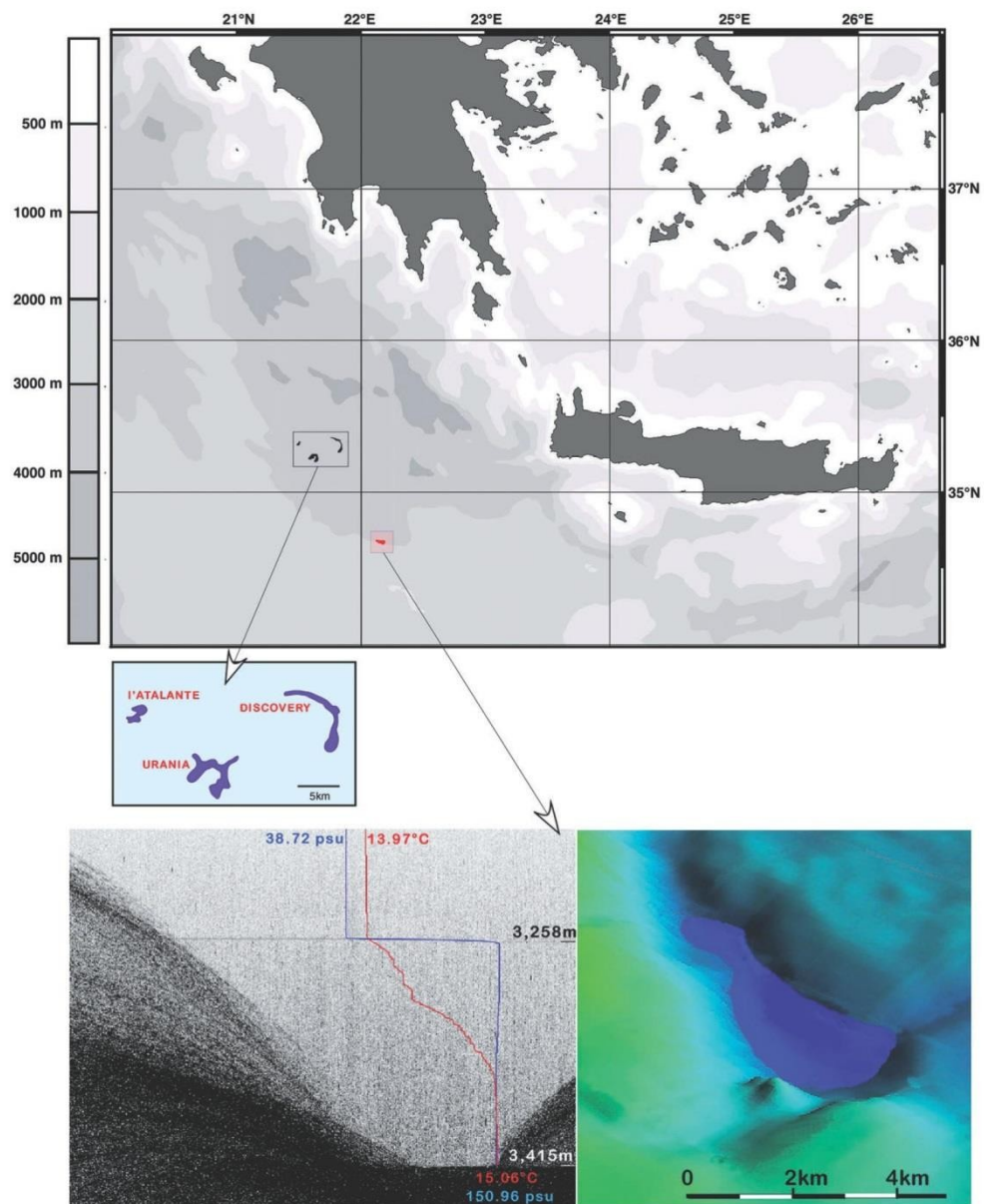


Fig. 1. Location of the *Thetis* Lake in the Eastern Mediterranean Sea. The map was constructed with Ocean Data View software (Schlitzer, 2010). The detailed map of the lake profile and seawater/anoxic water interface obtained by R/V *Urania* CHIRP SBP is shown (bottom left). Superimposed to the seismic section are the CTD profile, salinity data (blue) and temperature data (red) at the interface and at the bottom of the anoxic lake. 3D reconstruction of perspective relief of the swath bathymetry at *Thetis* Lake area. The shape of the lake is highlighted by blue colour.

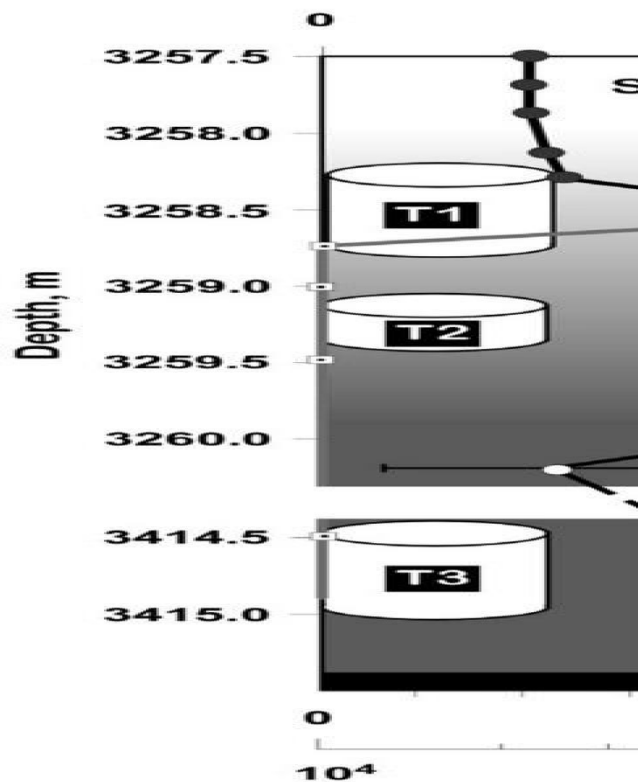


Fig. 2. Depth profiles of geochemical and biological data. The depth profile is shown by solid line and open squares; cell density is shown by solid line and indicated by word 'Cells'; salinity is shown by open circles; and data from three Niskin bottles indicated in the figure are shown by cylinders labeled T1, T2, and T3. The data were collected from the *Thetis* body brine.

Prokaryotic abundance and biovolume

At the depth of 3258.20 m, where the upper interface (UI) occurs, the cell concentration (from $9.63 \times 10^4 \pm 1.13 \times 10^4$ cell ml^{-1} to $2.11 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$ cell ml^{-1}) values) to 20 cm of the UI) (Fig. 2). For the next 20 cm, the cell numbers are high and then gradually decrease to the lower interface (LI) to $7.11 \times 10^4 \pm 6.71 \times 10^4$ cell ml^{-1} . The cell numbers remain quite constant within the *Thetis* body brine. The maximum value in cell density (5.11×10^6 cell ml^{-1}) was observed at the salinity of 3414.5 m, which corresponds to the undermost part of the *Thetis* body brine (Fig. 2), which was considered further as the lower interface (LI). Striking differences in the

Table 1. Chemical composition of the Eastern Mediterranean thalassohaline brines, 10-fold evaporated seawater brine (ESWB) and average seawater (ASW).

	<i>Thetis</i>	<i>L'Atalante</i>	<i>Bannock</i> ^a	<i>Tyro</i> ^a	<i>Urania</i>	ESWB ^a	ASW ^a
Density, kg m ⁻³	1.223	1.231	1.213	1.209	1.134	1.21	1.027
Temperature, °C	15.06	14.34	15.12	14.17	18.32	—	—
Salinity, g l ⁻¹	348	352	323	321	240	318	38.5
Na ⁺	4760	4670	4200	5300	3505	4480	480
Cl ⁻	5300	5290	5380	5350	3730	5080	560
Mg ²⁺	604	533	644	71.1	315	519	54.5
K ⁺	230	300	127	19.2	122	101	10.4
Ca ²⁺	9.0	5.9	16.3	35.4	31.6	5.5	10.5
SO ₄ ²⁻	265	323	135	52.7	107	180	28.9
HS ⁻	2.12	2.9	2.9	2.1	15	0	0
Br ⁻	6.0	5.0	9.0	1.28	9	7.9	0.86
H ₃ BO ₃	4.0	4.0	4.5	1.0	10.7	4.3	0.43
NH ₄ ⁺	2.75	2.87	3.35	1.3	2.87	0	0
Li ⁺ , µmol l ⁻¹	89	76	280	75	420	260	26

a. These data were taken from De Lange and colleagues (1990). All concentrations in mmol l⁻¹ unless otherwise stated.

LI (256–284‰, layer T2) and BB (348‰, layer T3). Archaeal and bacterial 16S rRNA clone libraries for each fraction were constructed. A total of 277 and 246 clones were obtained for archaeal and bacterial libraries respectively (Table S2). All analysed archaeal sequences were affiliated with two phyla of *Archaea*. One group of organisms was limited to the upper part of the halocline while

the majority of euryarchaeal groups were found in the more saline and anoxic layers including the brine (Fig. 4). At a lower taxonomic level, archaeal community of the *Thetis* Lake was characterized by the presence of seven different phylogenetic groups: *Thaumarchaeota* Marine Group I (MGI), *Halobacteriaceae*, MSBL1 (van der Wielen *et al.*, 2005), Halophilic Cluster 1 [HC1, (Jiang *et al.*,

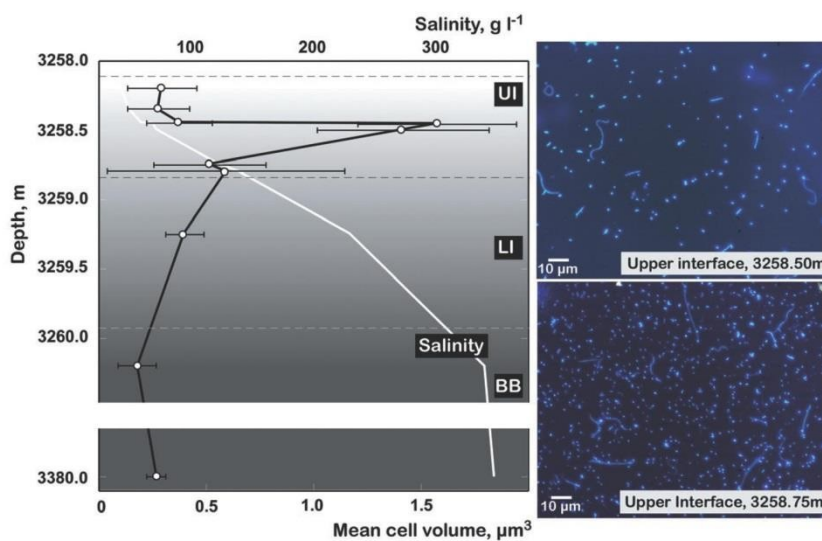
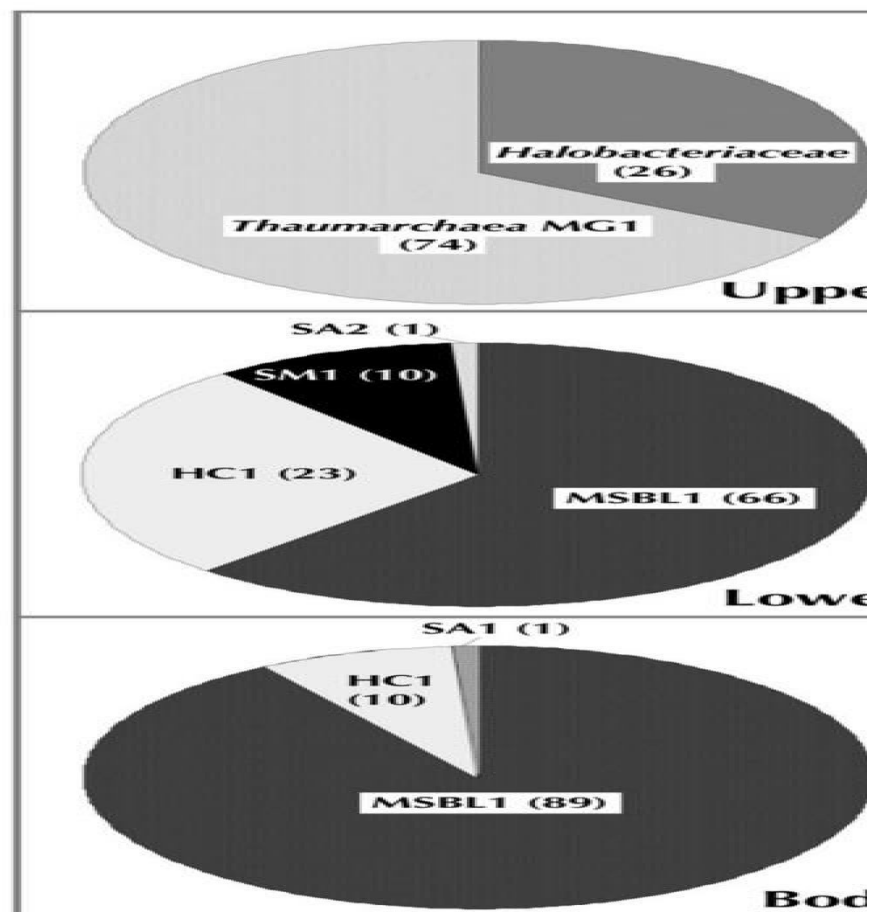


Fig. 3. Depth profile of mean volume of DAPI-stained microbial cells along the halocline and brine of Thetis Lake and micrographs of microbial cells collected at the maximum of mean volume. Scale bar corresponds to 10 µm.



2007)], Shaban Deep Archaea group SA2, (Eder *et al.*, 2002)] and a Sippenauer Moor 1 [SM1, (Rudolf *et al.*, 2002)] members of last division representative (Kormas *et al.*, 2009) and in another sample from vents of Napoli mud volcano (Heijs *et al.*, 2007) found in Mediterranean DHALs prior to 2002 (S1). None of the archaeal phylogenetic groups were found to be present within all three samples.

The clones obtained from the bacterial libraries were more diverse and clustered into several taxa: *Cytophagales*, Green non-sulfur bacteria, *mycetetes*, *Gamma*-, *Delta*- and *Epsilon*-proteobacteria. Candidate Divisions Kebrit Deep Bacteria (KDB), MSBL4, OP11-derived

© 2011 Society for Applied Microbiology

cline seems to be habitat for aerobic archaea and bacteria. Indeed, metagenomic analysis of the UI revealed the presence of *Thaumarchaeota* MGI and to *Halobacterium* found exclusively in this layer. *Thaumarchaeota* is the dominant fraction of marine bacterioplankton in seawater, as typical for the bacterioplankton in deep-sea water and sediments. The metabolism of these archaea is still under debate, but the successful isolation and genome analysis convincingly demonstrate that members of MGI possess the ability to grow lithoautotrophically by aerobic carbon fixation (Könneke *et al.*, 2005; Hallam *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007a; 2011; Walker *et al.*, 2010). Additionally, the presence of genes of heterotrophic lifestyle of *Thaumarchaeota* (Herndl *et al.*, 2005; Agogue *et al.*, 2006) type of metabolism, rather than the chemolithoautotrophic characteristic for *Thetis* *Thaumarchaeota*, and the presence of their key functional genes either for carbon fixation or ammonium oxidation have been found (below). Remaining 26% of all archaeal sequences from UI were affiliated to *Halosimplex* and *Haloterrigena* (Fig. 4). In the case with *L'Atalante* Lake (Yakimov *et al.*, 2007b), the narrow window of halocline and the presence of the UI and deeper zones is probably precluded by the anoxia respectively.

Metabolically active members of the UI community were affiliated to the *Epsilonproteobacteria* genetic groups with 45% of all bacterial sequences (Fig. 4). The closest sequences recovered from marine *L'Atalante* Lake (94.5% of similarity) were from the nearest cultivable representative group detected was KB1 (candidate clones analysed). Together with another division SB1 this division accounts for 50% of bacterial clones (Fig. 4). Similarly to the presence of *Bacteroidetes* members only in UI at low salinity, whereas KB1-related organisms are characterized by extreme broad halotolerance. *Bacteroidetes* (13% of all clones) were associated with sequences frequently retrieved from hot spring sediments, bearing sub-seafloor sediments, rich in organic matter and anoxic zone of the Cariaco Basin (Huber *et al.*, 1998; Madrid *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2006).

Lower interface. The archaeal community in the lower layer was more diverse, containing

Microbial diversity analysis in Thetis Lake

The number of operational taxonomic units (OTUs) of the diversity indices obtained for the three depths are shown in Table S2. As indicated by the dendrogram, this was confirmed by LIBSHUFF (Singleton) and DGGE fingerprinting analyses (Fig. S2). A clear difference was observed between UI compared with those of LI and BB. The microbial communities of all three depths were generally and very similar, in particular LI (Fig. S3). Despite of extreme salinity, BB is inhabited by the complex microbial community of 28 total phylotypes (97% sequenced), 17 bacterial and 11 archaeal phylotypes. This was compared with those of Mediterranean Sea DHALs brines. This analysis revealed a high percentage of *Thetis* phylotypes that accounted for more than 40% of the total in this lake. As corroborated with chemocline data, the *Thetis* Lake shared microbial phylotypes with hypersaline *Bannock*, whereas only eight *Thetis* phylotypes were found to be common with those of *Urania* Lake (Fig. S4).

Biochemical pathways in Thetis Lake

As shown above, the *Thetis* Lake is a steep chemo- and redoxcline between oxic water and dense anoxic hypersaline sediment, a spot of microbial activity. As in other hypersaline environments, the presence of elevated microbial biomass can be explained by the presence of a redoxcline that may supply energy to communities. The sedimentation of organic detritus from the water column, sulfide, elemental sulfur, reduced iron, and other by-products from chemoautotrophic activity (e.g., 2006; Borin *et al.*, 2009). *Thetis* brine has a high concentration of HS^- concentrations drop to zero at the lower part of chemocline most of the time. Members of *Proteobacteria* affiliated with *Thetis* organisms were found in both oxic and anoxic chemocline. To interpret their possible role in chemolithoautotrophy at the chemocline in *Thetis* ecosystem, we looked at their activity and monitored the presence of autotrophy. This was achieved by measuring ^{14}C -bicarbonate assimilation rates and the key enzymes involved in the reductive citric acid CO_2 -fixing cycle (e.g., 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (CBB) and citrate lyase) respectively.

© 2011 Society for Applied Microbiology

chemolithoautotrophic using the 3-hydroxybutyrate (3-HP/4-HB) cycle (Thauer, 2007). Specially designed primer pairs (see Table S1) were used to check the presence of mRNA of the genes encoding acetyl-CoA carboxylase (*AccA*) and 4-hydroxybutyrate CoA dehydratase (4-HBD), the key genes of the autotrophic pathway (Yakimov *et al.*, 2010). Neither *accA* nor *4-hbd* transcripts were detected, whereas PCR amplification product was detected in total DNA collected at all three *T* stations (not shown). One of the possible explanations for the MGI *Thaumarchaeota* are transposers in seawater with sinking organic debris, but they are not the member of the dominant microbial community.

To analyse the possible involvement of *Epsilonproteobacteria* in the CO_2 fixation process, the genes involved in the autotrophic reductive TCA cycle were monitored across all depths analysed. This CO_2 -fixing pathway is widespread in members of *Epsilonproteobacteria*, both microaerophilic or anaerobic (Coker *et al.*, 2010a,b). ATP citrate lyase is the key enzyme of the pathway and the transcripts of the gene coding for *acilB* (AciB) were subjected to the analysis. RT-PCR products were extracted from the overlying less saline and more oxygenated water column. Sequences retrieved (Fig. S5B) were affiliated to *acilB* genes of free-living members of *Epsilonproteobacteria* from hydrothermal vents (Hügler *et al.*, 2002). Sequences were also retrieved from the total DNA. The lack of *acilB* transcripts within this layer is in concordance with the low CO_2 -fixating activity, thus, suggest that the conditions and elevated salinity at the LI may prevent *teobacteria* were not metabolically active, living heterotrophically. Indeed, the *Epsilonproteobacteria* have recently been recognized as important mixotrophic organisms ubiquitous in marine ecosystems (Campbell *et al.*, 2006). The possibility is that *Gamma-* and *Beta-* *Proteobacteria* found in LI may be symbionts of larvae. Zubkov and colleagues (1999) found that the Black Sea one group of ciliates (species of the order *Scuticociliatida*) populated the zone and that a significant proportion of the ciliates ectosymbiotic bacteria. In the Mediterranean Sea, elevated concentrations of flagellated ciliates were evidently present both in the LI and in the BB (Alexander *et al.*, 2009). Analyzing the diversity of the *Thetis* Lake, we have demonstrated

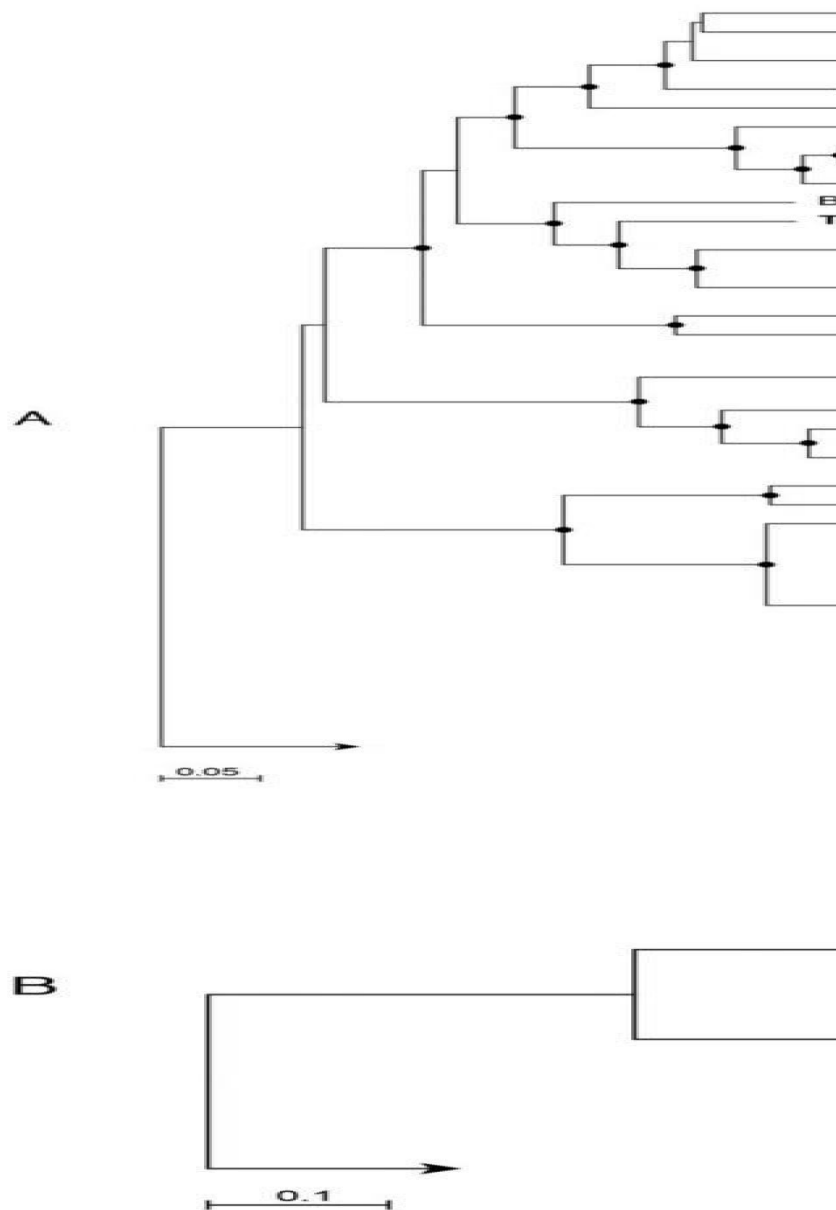


Fig. 5. Phylogenetic tree based on *aprA* (Jukes-Cantor distance matrix) using the M random repetitions. Sequences obtained in divergence.

© 2011 Society for Applied Microbiology

organisms revealed by 16S rRNA T2B_G11 and T2B_C10 riboclonal sequences pointed at the eventual interaction between eukaryotic and prokaryotic organisms in the ecosystem. Forty-six clones of *Thetis* were affiliated to any known APS reductase sequences were highly similar to each other, forming a tight cluster, distantly related to any other sequences recovered from the sediments of the Coorong (South Australia) (Fig. 5A). The relative abundances of *Thetis* transcripts, belonging to this cluster, were significantly higher in all UI, LI and BB clones analysed. The lack of cultivable relatives prevented the assignment of this cluster to thio-oxidizing bacteria, especially because of the absence of the *apsA* gene, which is characteristic of sulfate-reducing bacteria (Friedrich et al., 2004).

In contrast to the 16S rRNA data, the *Thetis* cluster was assigned to sulfate-reducing *Deltaproteobacteria* found at all depths of the *Thetis* Lagerstätten. In UI (18% of all UI clones) and LI (18% of all LI clones) and in BB (52% clones). The presence of *Thetis* in the upper layer of Mediterranean DHALs (*Uranium*) is in agreement with the features attributed to sulfate reducers in the Mediterranean (described previously (van der Weide et al., 2004) and proposed to be associated to *Deltaproteobacteria* reducers. Most of *Deltaproteobacteria* transcripts (73%) were organized in clusters with less than 75% of similarity to known reductase genes and likely represent a specific group of sulfate reducers, different from those found in other Mediterranean DHALs. They were affiliated with two groups retrieved from hydrothermal vent (Hügler et al., 2010). The high concentration of sulfate (2.12 mmol l⁻¹), detected in the *Thetis* Lagerstätten, and the presence of mRNA molecules of *aprA* gene in the *Thetis* lake suggested that sulfate-reducing microorganisms play an active role in the functioning of the ecosystem.

Methanogenesis and anaerobic methane oxidation

Previous measurements of methane production during incubation of samples from the Mediterranean DHALs indicated that sulfate reduction and methanogenesis are major microbial activities (Daffonchio et al., 2006; Bollmann et al., 2008). The latter process is carried out exclusively by *Euryarchaea* and could be monitored by the expression of *mcrA* gene, encoding for methyl-coenzyme M reductase. The presence of *mcrA* transcripts in the final reaction in the biogenic

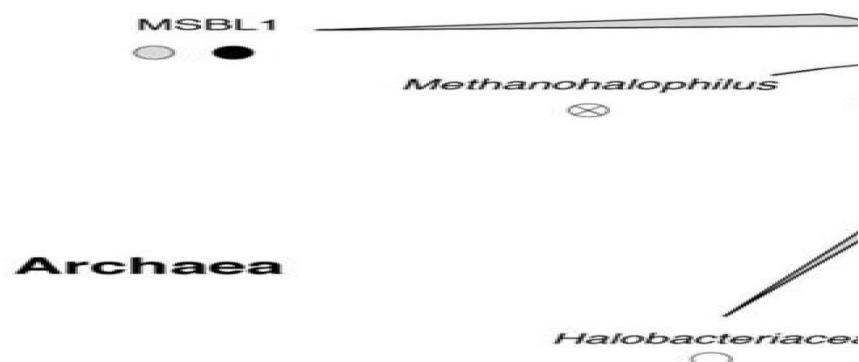


Fig. 6. A cumulative SSU rRNA-based phylogenetic tree of the Archaea groups found in Lake. The distribution of the groups along the lake profile is indicated by circles; lower interface (shaded circles); benthic zone (crossed circles). Scale bar represents 0.1 r

microbial life in this lake was per-
elucidation of various environmen-
hydrochemical and redox condition
dence that among numerous redox
cycling is likely a major process dri-

© 2011 Society for Applied Microbiology

this area of the Eastern Mediterranean chemolithoautotrophy, sulfate reduction and anaerobic methane oxidation as processes functioning in the *Thetis* in other Mediterranean Sea DHALs, a cal barrier other than the density, the chemocline forced the evolution of microbial communities highly adapted to this environment. Among 20 phylogenetic groups, only two bacterial groups were recorded at depths (Fig. 4). Most of *Thetis* is the candidate divisions found except for the anaerobic and anoxic environments with no other processes which preclude any speculations about the origin of DHAL-inhabiting microorganisms.

The origin of DHAL-inhabiting microorganisms and can be seen as a part of a relict microbial community isolated from the Mediterranean Sea (La Cono *et al.*, 2000). A most intriguing feature of these DHAL-specific halophiles are the populations that became trapped in the brine when the evaporites formed millions of years ago. In the case the more profound studies are conducted, how they have been surviving in this salty subterranean realm.

Experimental procedures

Oceanographic and geophysical data from the Thetis Lake depression

The morpho-bathymetric digital terrain model of the Mediterranean Sea at 500 m resolution was used to identify the confined depressions deeper or equal to 3200 m (on average 3200–3300 m) and therefore investigated with the RV *Urania* equipped with a transducer Bentos 3.5 KHz Chirp system, aiming at obtaining a perfectly stratified sample usually produced by the sharp salinity gradient at the seawater/brine interface, and confined

Sampling of halocline and brine in the Thetis Lake

Sampling of the *Thetis* Lake was carried out by the RV *Urania* at location 34.6698°N and 12.1111°E during oceanographic cruises in September 2008 (MIDDLE08) and September 2009 (MIDDLE09) (http://csbg.cnb.csic.es/mamba/index.php?option=com_content&view=article&id=123&Itemid=1). Samples were collected using 12 l Niskin bottles (General Oceanics, Miami, FL, USA) and a CTD (911plus conductivity-temperature-depth profiler, RBR Electronics, Bellevue, WA, USA) to measure oxygen concentration at chosen depths. Salinity was determined by the Winkler method with an automatic titration burette 716 DNS Titrino (Metrohm AG, Schwerzenbach, Switzerland). Samples for determining major ion concentrations were collected in 1000 ml dark polyethylene (PE) bottles and stored at room temperature. Alternatively, 110 ml of filtered

salinity of the samples, different concentrations were used. The basal medium contained per litre: 200 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.14 g, Trace elements 141 (DSMZ), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 mg, Casamino acids 0.2 g, NaHCO_3 5 g. The medium was prepared under 80% H_2 atmosphere. After sterilization, 10 ml of Medium 141 (DSMZ) was added. To support acetoclastic and methylotrophic methanogenesis, the medium was correspondingly supplemented with 20, 200 kPa), 10 mM l^{-1} acetate (for 20 mM l^{-1} trimethylamine (TMA). In the case of other reducers, the basal medium was supplemented with acetate (10 mM l^{-1}) and lactate (20 mM l^{-1}) and propionate (10 mM l^{-1}) correspondingly supplemented with Tryptone (10 mM l^{-1}), elemental sulfur (3 g l^{-1}) (10 mM l^{-1}) was used to enrich heterotrophic methanogens. Autotrophic anaerobes were enriched with three different supplements: elemental sulfur (3 g l^{-1}), nitrate (10 mM l^{-1}), $\text{Fe}(\text{III})$ oxide (90 mM l^{-1}). The gas phase was maintained at 200 kPa. The pH of the different media was adjusted before inoculation with 1 ml of sodium hydroxide solution. The cultures were incubated at 37°C.

Chemoautotrophy in the Thetis Lagoon

Primary production was calculated from the measurement of ^{14}C -bicarbonate uptake in 40 ml vials samples in triplicate. A fixed sample was used as blank. Samples were incubated for 7 days in the dark at 13°C (*in situ* temperature). The incubation was terminated by the addition of 10 ml of 2% (vol/vol) HCl , and the sample was filtered through 0.1 μm polycarbonate filters and washed three times with 10 ml of ultra-pure water and then exposed to concentrated HCl to eliminate any residue of radioactive bicarbonate. The filters were then placed in scintillation vials, filled with 10 ml of (PerkinElmer) scintillation liquid and analysed with a 1414 analyser, WinSpectral v3.0 (PerkinElmer). The values obtained in disintegrations per minute were converted into rates of production of organic carbon according to Herndl and colleagues (2005).

DNA and RNA purification

Total DNA and RNA were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Milan, Italy). The extractions were performed according to the manufacturer's instructions. The DNA samples were examined by agarose gel electrophoresis and concentrations were determined using a ND-1000 Spectrophotometer (Wilmington, NC). For cDNA synthesis, RNA-containing extractions were treated with DNA-free kit (Ambion, Austin, TX). The RNA concentration was determined using a NanoDrop spectrophotometer. The sample was immediately converted into cDNA using the

© 2011 Society for Applied Microbiology

1997) were performed using the (Pruesse *et al.*, 2007) and manual (Ludwig *et al.*, 2004). Functional sequences were manually aligned using (Pruesse *et al.*, 2007), directly or after translation. After alignment, the nearest neighbor method was used by the ARB and MEGA 4 program packages to generate the phylogenetic trees based on 16S rRNA and functional genes respectively. The statistical significance of inferred topologies was tested by using the same distance model (1000 bootstrap replicates). Operational taxonomic units were determined by using the 99% similarity (Schloss and Handelsman, 2005). The sequence sharing 99% and 98% nucleotide identity for 16S rRNA and nucleotide sequence

Species richness and diversity in using PAST (Paleontological Statistical <http://folk.uio.no/ohammer/past/> web indices were performed as described (2005). Coverage values were calculated using efficient clone libraries described the local community such as original bacteria (1953). The statistical significance in the of libraries was calculated by LIBSHU *et al.*, 2001). The computer program uga.edu/ was used to generate homologous coverage curves from clone libraries compared. Jukes—Cantor method by used to generate the 16S rRNA sequences (Tamura *et al.*, 2007).

Nucleotide sequence accession nu

The nucleotide sequences reported in this study were deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers: HQ658668 to HQ658672 for the archaeal 16S rRNA gene sequences, HQ658735 for the bacterial 16S rRNA gene sequence, HQ658634 to HQ658639 for the *hsp70* gene sequences, HQ658640 to HQ658661 for the *hsp90* gene sequences, HQ658662 for the *hsp60* gene sequence, HQ658663 for the bacterial *hsp70* gene sequence, and HQ658664 to HQ658667 for the *hsp90* gene sequences of the isolates.

Acknowledgements

The name *Thetis* to the new discovery, the remembrance of the CNR Research vessel, which sunk on the 3rd of August 2007 in Sicily. During this accident the Russian Mikheychik died. This work was performed with the support of CNR in frames of ESF PI 004 (MIDDLE) and with the support of EU Project FP7-KBBE-2009-2B-2269. Captain Emanuele Gentile and all crew members are valuable professionalism and support. Discoveries were possible only because data made available by other Institutions: CIESM and Dr Benoit Loubrieu of IFR 500 m resolution DTM data.

- Cita, M.B. (2006) Exhumation of Mesozoic deep-sea and creation of deep anoxic basins. *Sediment Geol* **188–189**: 3–13.
- Cita, M.B., Aghib, F.S., Cambi, A., Cappelletti, C., Erba, E., *et al.* (1985) Precipitazione di un bacino anossico profondo; primarie, idrologiche, paleontologiche (Mediterraneo orientale). *G Geol* **47**: 1–14.
- Clarke, K.R., and Warwick, R.M. (1993) *Communities: An Approach to Statistical Interpretation*, 1st edn. Plymouth, UK: Laboratory, p. 144.
- Clarke, K.R., and Warwick, R.M. (2001) *Communities: An Approach to Statistical Interpretation*, 2nd edn. Plymouth, UK: Laboratory, p. 144.
- Daffonchio, D., Borin, S., Brusa, T., Wöhlert, P.W., Bolhuis, H., *et al.* (2000) A microbial network in the oxic-anoxic transition zone. *Nature* **440**: 203–207.
- De Lange, G.J., Middleburg, J.J., van der Zanden, G.W., III, Hydes, D.J., Woittek, D., *et al.* (1990) Composition of anoxic hypersaline Bannock Basins, Eastern Mediterranean. *Mar Geol* **63–88**.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D., *et al.* (2003) Molecular characterization of bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2765–2772.
- Eder, W., Schmidt, M., Koch, M., Garbe, R., Huber, R. (2002) Prokaryotic phylogeny corresponding geochemical data at the interface of the Shaban Deep, Red Sea. *Mar Geol* **4**: 758–763.
- Edgcomb, V., Orsi, W., Leslin, C., Eide, J., Jeon, S.O., *et al.* (2009) Protist diversity within the brine and halocline of deep-sea basins in the eastern Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser* **13**: 151–167.
- Friedrich, M.W. (2002) Phylogenetic analysis of lateral transfers of adenosine-59-phosphatase genes among sulfate-reducing bacteria. *J Bacteriol* **184**: 278–289.
- Fry, J.C. (1990) Direct methods and indirect methods. *Method Microbiol* **22**: 41–85.
- Glaubit, S., Labrenz, M., Jost, M., and Jørgensen, B.B. (2000) Diversity of active chemolithoautotrophic bacteria in a sulfidic zone of a Black Sea pelagic zone. *Microbiol Ecol* **74**: 32–41.
- Good, I.J. (1953) The population frequency of the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237–264.
- Grabarse, W., Mahler, F., Shima, S., and Ermler, U. (2000) Comparison of the activity of M reductases from phylogenetically diverse bacteria: unusual amino acid modification, characterization. *J Mol Biol* **303**: 329–344.
- Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, J., Rokhsar, D., Richardson, P.M., *et al.* (2000) Methanogenesis: testing the hypothesis of a microbial consortium. *Science* **305**: 1457–1460.

- retrieved from estuarine sediments. *Mar Ecol Prog Ser* **67**: 3314–3318.
- Karner, M.B., De Long, E.F., and Karl, D.M. (1990) Bacterial dominance in the mesopelagic zone of the Sargasso Sea. *Nature* **409**: 507–511.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., Toranzo, A., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2004) Autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in the ocean. *Nature* **437**: 543–546.
- Kormas, K.A., Tanaka, H., Hanada, H., and Kato, T. (2009) Apparent richness and community structure of *Bacteria* and *Archaea* in geothermal fields. *Appl Environ Microbiol* **57**: 113–122.
- La Cono, V., Smedile, F., Ferrer, M., Cappelletti, L., and Yakimov, M.M. (2010) Genomic diversity and carbon assimilation pathways of Crenarchaea. *Microbial Biotechnol* **5**: 1–12.
- La Ferla, R., and Leonardi, M. (2005) Genetic diversity of biomass and morphotype variability in a coastal zone of the Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser* **26**: 82–92.
- Lee, S., and Fuhrman, A. (1987) Relationship between volume and biomass of naturally derived marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **53**: 1298–1303.
- López-López, A., Yarza, P., Richter, A., Antón, J., Niemann, H., et al. (2011) Microbial communities in anaerobic salterns. *Environ Microbiol Rep* **2**: 20–28.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., and Yadhukumar, P. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1371–1372.
- McCaffrey, M.A., Lazar, B., and Hovgaard, K. (2000) Evaporation path of seawater and the role of halite. *J Sediment Petrol* **70**: 100–108.
- McGenity, T.J., Gemmell, R.T., Grant, A., and H. (2000) Origins of halophilic microbial communities in salt deposits. *Environ Microbiol Rep* **2**: 20–28.
- Madrid, V.M., Taylor, G.T., Scranton, M., and A.Y. (2001) Phylogenetic diversity of microbial communities in the anoxic zone of the Black Sea. *Environ Microbiol* **67**: 1663–1674.
- Massana, R., Gasol, J.P., Bjørnsen, P., and Ström, A. (1998) Identifying and counting aquatic microorganisms. *Mar Ecol Prog Ser* **25**: 943–948.
- MEDRIFF Consortium (1995) Three billion years of life on the seafloor of the eastern Mediterranean. *Nature* **376**: 313.
- Meyer, B., and Kuever, J. (2007a) Microbial distribution and phylogeny of dissimilatory phosphosulfate reductase-encoding bacteria and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microb Drug Resist* **10**: 349–358.
- Meyer, B., and Kuever, J. (2007b) Functional diversity of alpha and beta subunits of the dissimilatory phosphosulfate (APS) reductase in prokaryotes – origin and evolution of the sulfate-reduction pathway. *Microb Drug Resist* **10**: 359–368.
- Meyer, B., and Kuever, J. (2007c) Microbial diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microb Drug Resist* **10**: 369–378.

- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Kolganov, E.M., Berg, I.A., and Muyzer, G. (2007) *Halophila* sp. nov., a moderately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from hypersaline lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **2380**.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Tamura, K. (2004) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **21**: 1599.
- Taylor, G.T., Iabichella, M., Ho, T.-Y., and R.C., Müller-Karger, F., *et al.* (2007) The redox transition zone of the Cariacus midwater source of organic carbon. *Oceanogr* **46**: 148–163.
- Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Kysela, D., Sylva, S.P., *et al.* (2002) Hydrothermal sediments in the Guadalupe Channel: a new source of organic carbon for anaerobic methanotrophic communities. *Microbiol* **68**: 1994–2007.
- Thauer, R.K. (2007) A fifth pathway for carbon fixation. *Science* **318**: 1732–1733.
- Ulrich, W., and Ollik, M. (2005) Limiting species richness: the use of relative species richness. *Divers Distrib* **11**: 265–273.
- Vengosh, A., and Starinsky, A. (1993) Sea water in deep basins of the Eastern Mediterranean. *Mar Geol* **1–2**: 15–19.
- Vidussi, F., Claustre, H., Manca, B., L. J.-C. (2001) Phytoplankton pigments in the upper thermocline circulation in the Eastern Mediterranean Sea during winter. *J Geophys Res* **106**: 19956.
- Walker, C.B., de la Torre, J.R., Klotzel, N., Arp, D.J., *et al.* (2010) *Nitrospira* genome reveals unique mechanisms for autotrophy in globally distributed marine bacteria. *Natl Acad Sci USA* **107**: 8818–8823.
- Wallmann, K.J., Suess, E., Westbroek, K., Cita, M.B., and the Meddriff coring group (2007) Brines on the Mediterranean sea floor. *Mar Geol* **232**.
- van der Wielen, P.W. (2006) Divergence of bisphosphate carboxylase/oxygenase in the MgCl₂-dominated deep hypersaline anhydrous environment: a discovery. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 199–207.
- van der Wielen, P.W., and Heijs, S.K. (2006) Prokaryotic communities in two deep basins in the Eastern Mediterranean. *Microbiol* **9**: 1335–1340.
- van der Wielen, P.W., Bolhuis, H., Boer, J., Corselli, C., Giuliano, L., *et al.* (2007) Prokaryotic life in deep hypersaline anhydrous basins. *Microbiol* **307**: 121–123.
- Yakimov, M.M., La Cono, V., Denaro, F., Brini, F., Timmis, K.N., *et al.* (2007) Prokaryotic communities of brine, in the above the halocline of deep anhydrous Eastern Mediterranean Sea. *ISME J* **11**: 1995–2007.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Cappellacci, G., Golyshin, P.N. (2007b) Microbial C

neighbour-joining analysis/Poisson correction and by neighbour-joining method/uncorrected matrix using the MEGA software respectively. The scale bar represents 2% amino acid (A) and 0.01 substitutions per nucleotide position (B). Bootstrap values are shown as open and filled circles, calculated over 1000 random replicates. The sequences obtained in this study are indicated in **Table S1**. Primer sequences used in

Résumé. Depuis 1983, l'existence de bassins hypersalés profonds anoxiques (DHABs Deep Hypersaline Anoxic Basin) dans la Méditerranée orientale a été révélée. Ces bassins qui représentent un environnement extrême (anoxie, hypersalé, pression hydrostatique, absence de lumière) font l'objet de nombreuses études microbiologiques qui se sont intensifiées depuis une quinzaine d'années. Les approches moléculaires ont révélé l'existence de communautés microbiennes actives mais encore incultivées (ex : lignées MSBL, Mediteranean Sea Brine Lake) dans ces DHABs, avec notamment des métabolismes microbiens tels que la méthanogénèse et la sulfato-réduction. A ce jour, aucun représentant cultivé affilié à ces groupes d'incultivés ou réalisant les deux processus microbiens cités n'ont été caractérisés. Les objectifs majeurs de ce travail de thèse portaient sur l'identification des principaux groupes métaboliques microbiens et particulièrement les acteurs microbiens impliqués dans les processus dominants de méthanogénèse et de sulfato-réduction. Les approches culturales ont conduit à l'isolement de 3 souches de méthanogènes halophiles modérées de trois bassins (Thetis, Kryos, Tyro) affiliées phylogénétiquement au genre *Methanohalophilus*. Une caractérisation chimio-taxonomique et génomique de ces souches a été menée. Les résultats ont démontré la capacité des souches isolées à se développer dans les conditions *in situ* (température, salinité et pression). L'analyse des génomes des souches des bassins hypersalés (milieux profonds vs milieux de surface) a révélé d'une part une réduction de 10% de la taille des génomes des souches isolées du milieu profond et d'autre part indique une adaptation des souches aux conditions *in situ*. L'isolement de microorganismes appartenant notamment au genre *Marinobacter*, *Halomomas* et *Halanaerobium* permet de proposer un modèle d'interaction syntrophique conduisant à la production des composés méthylés nécessaires aux souches du genre *Methanohalophilus* pour la réaction de méthanogénèse méthylotrophe dans ces bassins. Un nouveau genre bactérien proche de séquences issues des DHABs et appartenant au phylum des *Bacteroidetes* a été isolé et est maintenu en culture stable. Ce microorganisme très difficile à cultiver représente le premier isolat appartenant à un des groupes d'incultivés mis en évidence dans les DHABs.

Mots Clefs : DHABs, environnement extrême, *Methanohalophilus*, pression hydrostatique, génome.

Abstract. Since 1983, the existence of Deep Hypersaline anoxic basins (DHABs) has been revealed in the Eastern Mediterranean basin. These basins which represent extremes environments (anoxic, hypersalty, dark, high hydrostatic pressure) have been under investigation and increasing interest the last fifteen years. The molecular approaches revealed the presence of active and uncultivated microbial communities in the DHABs with two main metabolic processes such as methanogenesis and sulphate-reduction. Until now, no representative strain of the different uncultivated lineages thriving in the DHABs (ex : lineages MSBL, Mediteranean Sea Brine Lake) or involved in the two processes have been yet cultivated. The main objectives of the thesis work were to (i) identify the microbial key players in the processes of methanogenesis and sulphate-reduction, (ii) isolate new microbes adapted to hypersaline conditions and to study their physiology, (iii) to compare the genome and the physiology of the strains belonging to the genus *Methanohalophilus*, isolated from three different basins (Thetis, Kryos, Tyro), (iv) attempt to cultivate and isolate strains belonging to the uncultivated lineages described in the DHABs. Our cultivation approach allow to cultivate and isolate three methanogenic methylotrophic moderately halophile strains belonging to the genus *Methanohalophilus* from the basins Thetis, Kryos and Tyro. A chemo-taxonomic and genomic characterization of the isolates revealed the capacity of the strains to grow under *in situ* conditions. Genome analysis revealed the streamlining reduction (by 10%) of the 3 genomes of our deep sea isolates compared to the terrestrial species of the genus *Methanohalophilus* and also an adaptation of the isolates to the *in situ* conditions. The isolate SLHTYRO represent a new species of the genus for which we propose the name *M. profundus* strain SLHTYRO. Other microbial isolates belonging to genus *Marinobacter*, *Halomonas*, and *Halanaerobium* obtained could be involved in a syntrophic relationship with archaeal partners of the *Methanohalophilus* genus in order to produce methylated compounds from betaine which in turn is used as catabolic substrates in the methanogenesis process. A new strain belonging to a new genus affiliated the the *Bacteroidetes* phylum and phylogenetically close to clones identified in the DHABs has been cultivated and isolated in pure culture. This hard to grow isolate represents the first cultivated members of the diverse uncultivated lineages discovered in the DHABs.

Key words : DHABs, extreme environnement, *Methanohalophilus*, hydrostatic pressure, genome.