



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BREST
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BREST
Mention : Écologie Microbienne
École Doctorale des Sciences de la Mer

Valentin Crépeau

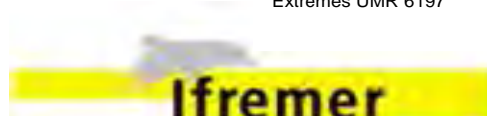
Préparée à l'UMR 6197, Ifremer-CNRS-UBO
Établissement de rattachement : Ifremer, Centre de Brest
Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

Diversité et fonctions dans les tapis microbiens du site hydrothermal de Lucky Strike.

La thèse sera soutenue le 8 décembre 2010

devant le jury composé de :

Philippe Bertin (Rapporteur)
Professeur, Université de Strasbourg
Francois Lallier (Rapporteur)
Professeur, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)
Bernard OLLIVIER (Examineur)
Directeur de recherche, IRD, Marseille
Vianney Pichereau (Examineur)
Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Georges Barbier (Examineur)
Professeur, Université de Bretagne Occidentale
Anne Godfroy (Directeur de thèse)
Directrice du Laboratoire de Microbiologie des Environnements
Extrêmes UMR 6197



Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, à l'IFREMER de Brest. Il s'inscrit dans le cadre de l'ANR Deep Oases et du GDR ECCHIS, qui l'ont en partie financé.

Je tiens en premier lieu à exprimer ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Madame Anne Godfroy, responsable du laboratoire, qui m'a permis de réaliser ce travail de thèse, ainsi qu'à Marie-Anne Cambon pour son soutien et ses conseils.

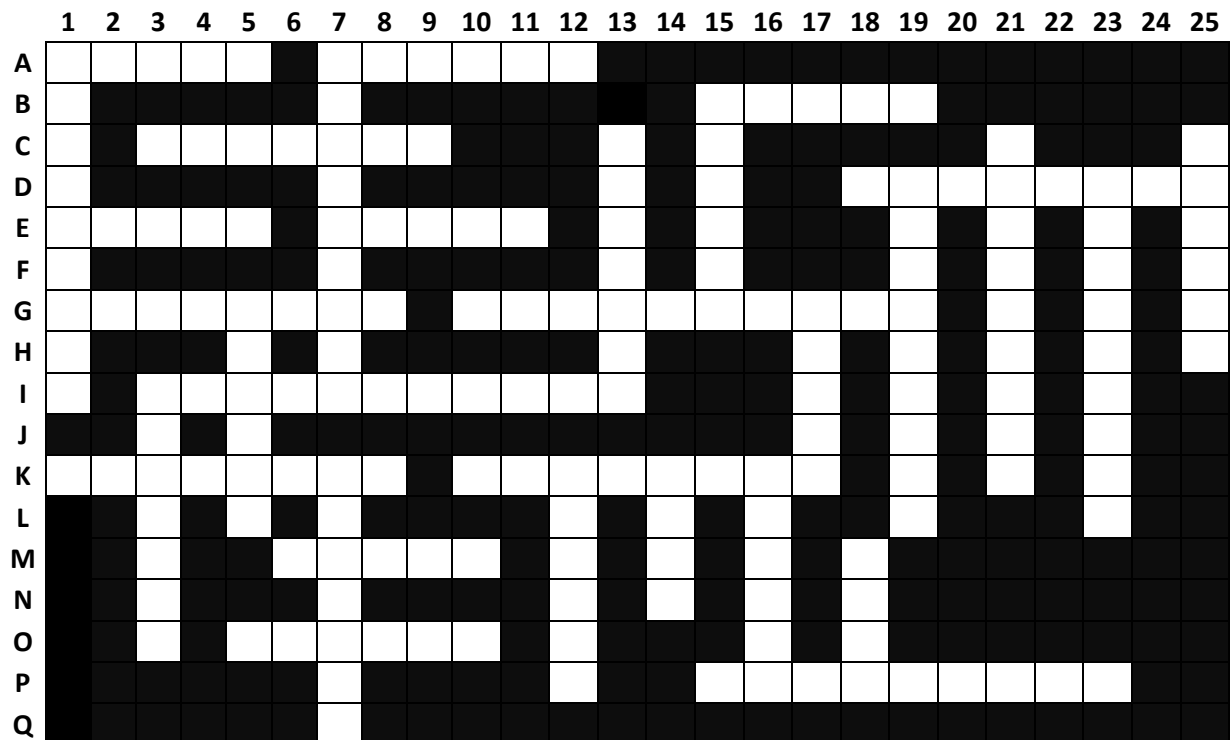
Je remercie également ceux qui me font l'honneur d'examiner ce travail : M. Philippe Bertin, professeur à l'Université de Strasbourg et M. François Lallier, professeur à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), qui ont jugé de l'intérêt du manuscrit en tant que rapporteurs, ainsi que M. Bernard OLLIVIER, directeur de recherche (IRD, Marseille), M. Vianney Pichereau et M. Georges Barbier, professeurs à l'Université de Bretagne Occidentale, pour leur participation au jury de thèse.

Merci aux membres de mon comité de thèse : Jozée Sarrazin, Karine Alain et Rémy Guyoneaud, ainsi qu'à Pierre-Marie Sarradin pour leurs avis et recommandations.

Ma gratitude va aussi à toutes les personnes qui m'ont aidé techniquement au cours de ces trois années. Merci donc à mes fournisseurs d'amorces et d'idées : Isabelle Boutet, Gaëtan Burgaud et Olivier Mouchel, à Françoise qui m'a beaucoup aidé pour la partie fermentation, au Manager qui a tenté de m'expliquer comment fonctionne l'apotome, à Adrien qui a effectué des PCR quantitatives sur mes échantillons et à Philippe Crassous pour la partie microscopie électronique.

Merci également à tous les autres membres du laboratoire, ainsi qu'à l'équipage et aux chefs de mission durant les campagnes Bathyluck et MoMAR-08.

Et enfin un grand merci aux cruciverbistes qui se reconnaîtront. Les surnoms sont autorisés. Communiquez-moi vos grilles complétées pour participer à la grande tombola de Noël. Jeu gratuit sans obligation d'achat.



- A** : Star de la féria. Le James Cook des temps modernes.
B : Mon magret de canard.
C : Robe de chambre incandescente.
D : La reine de l'immobilier.
E : Mon canard. The human jukebox.
G : Membre de l'IRA en exil. *Utrique fidelis*.
I : Du haut de sa vigie elle surveille le pays des tomates plates.
K : Oui mais non ! Il est trop beau !
M : Perdue dans les glaces.
O : Il recherche des cèpes au fond de l'océan.
P : *Bene, bene, respondere*.

- 1** : 100% bio.
3 : L'homme aux mille questions.
5 : A-Dilla.
7 : Pilote de l'Enterprise. ça fart, lol ?
12 : Estragon et ciboulette, avec un arrière goût de noisette.
13 : Sale³
14 : Il attend la vague.
15 : Il n'est pas là, il a piscine.
16 : Elle devrait lire Stendhal au lieu de travailler.
17 : *Nec pluribus impar*.
18 : Elle est très fière de son nouveau lave-vaisselle.
19 : Capiste n'aimant pas les chats.
21 : Malicia.
23 : « Citoyenne du Monde ».
- 25** : Breakdance !

Table des matières

Liste des abréviations utilisées	11
Liste des illustrations.....	13
Liste des tableaux.....	15
Introduction générale.....	17
1. Contexte de l'étude	23
1.1. Les écosystèmes chimiosynthétiques des océans.....	25
1.1.1. Des oasis dans le désert ?.....	25
1.1.2. Les grottes sous-marines enrichies en sulfures.....	26
1.1.3. Les écosystèmes associés aux bois coulés et aux carcasses de baleines.	27
1.1.4. Les zones d'émission de fluides froids	29
1.1.4.1. <i>Origines du méthane et nature des fluides</i>	29
1.1.4.2. <i>Biotope observé</i>	31
1.1.5. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds	32
1.1.5.1. <i>Le phénomène hydrothermal</i>	32
1.1.5.2. <i>Les édifices hydrothermaux</i>	33
1.1.5.3. <i>Les sources hydrothermales de l'Atlantique</i>	35
1.1.5.4. <i>Le site de Lucky Strike</i>	36
1.2. Les communautés microbiennes des écosystèmes hydrothermaux océaniques.....	38
1.2.1. Types d'habitats microbiens et communautés associées	38
1.2.2. La diversité microbienne	39
1.2.3. Rappels de quelques notions sur les métabolismes bactériens.....	40
1.2.4. Les micro-organismes à la base du réseau trophique.....	41
1.3. Diversité des métabolismes dans les écosystèmes hydrothermaux	44
1.3.1. Métabolismes microbiens attendus dans les écosystèmes hydrothermaux	44
1.3.2. Le cycle du fer.....	45
1.3.3. Le cycle de l'hydrogène	46
1.3.4. Le cycle de l'azote.....	47
1.3.5. Le cycle du carbone	49

1.3.5.1.	<i>Utilisation du carbone organique (1 et 2, Fig. 11)</i>	49
1.3.5.2.	<i>Production primaire (3 Fig. 11)</i>	50
1.3.5.3.	<i>Méthanogenèse et oxydations du méthane (4, 5 et 6, Fig. 11)</i>	52
1.3.6.	Le cycle du soufre.....	54
1.3.6.1.	<i>La réduction des sulfates (1, Fig. 15)</i>	55
1.3.6.2.	<i>La sulfo-réduction (2, Fig. 15)</i>	56
1.3.6.3.	<i>La sulfo-oxydation (3, Fig. 15)</i>	57
1.4.	La faune des écosystèmes hydrothermaux océaniques	59
1.4.1.	Caractéristiques.....	59
1.4.2.	Le réseau trophique : importance des symbioses.....	60
1.4.3.	La faune du site de Lucky Strike.....	61
1.4.4.	Les mytilidés symbiotiques : cas de <i>B. azoricus</i> et de <i>B. puteoserpentis</i>	62
1.4.4.1.	<i>Écologie des mytilidés symbiotiques</i>	62
1.4.4.2.	<i>La double symbiose bactérienne des mytilidés</i>	63
1.5.	Les tapis microbiens	65
1.5.1.	Définition et généralités.....	65
1.5.2.	Intérêts de la croissance en biofilms.....	66
1.5.3.	Les tapis microbiens des écosystèmes chimiosynthétiques.....	68
1.5.3.1.	<i>Les tapis microbiens des grottes sous marines et terrestres</i>	68
1.5.3.2.	<i>Les tapis microbiens associés aux carcasses de baleines et bois coulés</i>	69
1.5.3.3.	<i>Les tapis microbiens des zones d'émission de fluides froids</i>	70
1.5.3.4.	<i>Les tapis des écosystèmes hydrothermaux</i>	73
1.5.4.	Place des tapis microbiens sur le site de Lucky Strike.....	80
1.5.5.	Les bactéries filamenteuses de l'ordre des <i>Thiotrichales</i>	80
1.5.6.	Cultiver les <i>Thiotrichales</i>	82
2.	Matériel et méthodes	85
2.1.	Échantillonnages des tapis microbiens	87
2.1.1.	Site d'étude.....	87
2.1.2.	Échantillonnages EXOMAR et MoMARETO.....	87
2.1.3.	Échantillonnage MoMAR-08.....	88
2.1.4.	Échantillonnage Bathyluck.....	89

2.2. Observations des tapis <i>in situ</i> et par microscopie.....	90
2.2.1. Observation <i>in situ</i>	90
2.2.2. Microscopie photonique et par contraste interférentiel différentiel.....	90
2.2.3. Hybridation Fluorescente <i>in situ</i>	90
2.2.4. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB)	91
2.3. Caractérisation phylogénétique et fonctionnelle des tapis microbiens du site de Lucky Strike.....	92
2.3.1. Extraction de l'ADN et amplification PCR.....	92
2.3.2. Extraction des ARN totaux et amplification par RT-PCR	93
2.3.3. Construction de la banque de clones et séquençage.....	94
2.3.4. Analyse phylogénétique	95
2.4. Analyse par Q-PCR des communautés des tapis microbiens.	95
2.5. Suivi des populations sulfo-oxydantes en fermenteur.....	96
2.5.1. Description du système de culture utilisant le fermenteur gas-lift	96
2.5.2. Conditions de culture	99
2.5.3. Prélèvement d'échantillons.....	102
2.5.4. Analyses moléculaires	102
2.5.5. Dénombrement cellulaire et isolements.....	103
2.5.6. Suivi par hybridation fluorescente <i>in situ</i>	104
2.6. Cultures réalisées durant les campagnes MoMAR-08 et Bathyluck.....	104
2.6.1. Cultures réalisées à partir d'échantillons de MoMAR-08	104
2.6.2. Cultures réalisées à partir d'échantillons de Bathyluck (2009).....	105
3. Résultats.....	107
3.1. Diversités phylogénétique et fonctionnelle des tapis microbiens du site hydrothermal de Lucky Strike (MAR).....	109
3.2. Résultats complémentaires	157
3.2.1. Observations <i>in situ</i> et microscopiques	157
3.2.2. Analyse par Q-PCR des communautés bactérienne et archéenne des tapis microbiens ...	163
3.2.3. Caractérisation de la population bactérienne du système digestif de <i>B. azoricus</i>	165
3.2.3.1. Méthode	165
3.2.3.2. Résultats et discussion.....	165
3.2.4. Caractérisation de la diversité fongique	167

3.2.4.1.	<i>Introduction</i>	167
3.2.4.2.	<i>Méthode</i>	167
3.2.4.3.	<i>Résultats et discussion</i>	168
3.3.	Suivi moléculaire d'une culture d'organismes sulfo-oxydants en fermenteur	171
3.4.	Cultures d'enrichissement en batch	205
3.4.1.	Cultures gélosées en gradients.....	206
3.4.2.	Cultures de méthanotrophes et de sulfo-oxydants	206
4.	Bilan et perspectives	209
4.1.	Bilan sur les techniques utilisées	211
4.1.1.	Techniques d'échantillonnages	211
4.1.2.	Approches moléculaires	211
4.1.3.	Approches culturelles.....	212
4.1.4.	Suivi moléculaire en fermenteur.....	213
4.2.	Populations observées	213
4.2.1.	Archées.....	213
4.2.2.	Bactéries.....	214
4.2.3.	Champignons.....	215
4.3.	Diversité des métabolismes actifs dans les tapis	216
4.4.	Interactions avec l'environnement	217
4.5.	Dernières dispositions	219
5.	Bibliographie	221
6.	Annexes	241
6.1.	Annexe 1 : protocole d'hybridation fluorescente <i>in situ</i>	243
6.2.	Annexe 2 : composition des milieux de culture	248
6.2.1.	Milieu MJ 4	248
6.2.2.	Milieu gélosé pour <i>Beggiatoa</i> avec une base SME	249
6.2.3.	Fluide hydrothermal dilué et méthane	252
6.3.	Annexe 3 : Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents	253

Liste des abréviations utilisées

ADN : acide désoxyribonucléique

AOM : anaerobic oxidation of methane

APS : adénosine-5' phosphosulfate réductase

ARN : acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomique

ATP: adénosine tri-phosphate

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DMSO : diméthyl sulfoxyde

dNTP : desoxyribonucléotide triphosphate

EPR : East Pacific Rise

EPS: extrapolymeric substances

FISH : fluorescent *in situ* hybridization

FITC: fluorescein isothiocyanate

kpb : kilo paires de bases

MAR : mid-Atlantic ridge

MEB : microscopie électronique à balayage

MMO : méthane mono-oxygénase

OTU : operational taxonomic unit

pb : paire de bases

PCR : polymerase chain reaction

pMMO : méthane mono-oxygénase particulaire

RFLP : restriction fragment length polymorphism

RT-PCR : reverse transcription PCR

rTCA : reverse tri-carboxylic acid

RuBisCO : ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase:

sMMo : méthane mono-oxygénase soluble

Liste des illustrations

FIGURE 1. CARCASSE DE BALEINE APRES 18 MOIS, BASSIN DE SANTA, 1670M (A GAUCHE). OS DE BALEINES RECOUVERTS DE TAPIS MICROBIENS (A DROITE). C. SMITH & MIKE DEGRUY, UNIVERSITY D'HAWAII [®] . HTTP://WWW.NOC.SOTON.AC.UK/CHESSE/EDUCATION/EDU_WHALE.PHP	28
FIGURE 2. PRINCIPALES ZONES D'EMISSIONS DE FLUIDES FROIDS DANS LE MONDE (RITT 2010).	30
FIGURE 3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX PROCESSUS MICROBIENS SE DEROULANT DANS LES SEDIMENTS MARINS DES ZONES D'EMISSIONS DE FLUIDES FROIDS RICHES EN METHANE ET EN HYDROGENE SULFURE. THIERRY NADALIG ET SEBASTIEN DUPERRON (DUPERRON 2005), MODIFIE PAR CASSANDRE LAZAR (LAZAR, 2009).	32
FIGURE 4. LOCALISATION DES DORSALES OCEANIQUES ET DES SITES HYDROTHERMAUX MARINS ETUDIES. HTTP://WWW.IFREMER.FR/DROEP/N-SITES-HYDRO.HTML	33
FIGURE 5. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SOURCES HYDROTHERMALE OCEANIQUES (BAROSS AND DEMING, 1985; ERAUSO, 1994)	34
FIGURE 6. FIG. CHAMPS HYDROTHERMAUX LE LONG DE LA DORSALE MEDIO-ATLANTIQUE, IFREMER [®]	36
FIGURE 7. CARTE (A) ET BATHYMETRIE HAUTE RESOLUTION (B) DU CHAMP HYDROTHERMAL DE LUCKY STRIKE. CIRCUIT DU ROV VICTOR 6000 DURANT LA BATHYMETRIE (C). NWC: NORTHWEST VOLCANIC CONE; NEC: NORTHEAST VOLCANIC CONE; SC: SOUTH VOLCANIC CONE. MODIFIE D'APRES ONDREAS (ONDREAS ET AL., 2009).	37
FIGURE 8. DIVERSITE DES METABOLISMES CHIMIOTROPHES. LA CROISSANCE DES PROCARYOTES EN FONCTION DES DONNEURS D'ELECTRONS ORGANIQUES OU INORGANIQUES EST EXPRIMEE COMME DES POURCENTAGES VARIABLES D'ENERGIE TOTALE ET DE CARBONE NECESSAIRE. MODIFIE PAR BYRNE (BYRNE, 2008) D'APRES (KARL, 1995).....	41
FIGURE 9. PRINCIPAUX COUPLES D'OXYDOREDUCTION (MADIGAN AND MARTINKO, 2007).....	42
FIGURE 10. TRANSFORMATIONS MICROBIENNES DE L'AZOTE DANS LES ENVIRONNEMENTS MARINS OXIQUES ET ANOXIQUES (FRANCIS ET AL., 2007). DNRA : REDUCTION DISSIMILATRICE DU NITRATE EN AMMONIUM. AMO : AMMONIUM MONO-OXYGENASE. HAO : HYDROXYLAMINE OXYDOREDUCTASE BACTERIENNE. NIR : GENE NITRITE REDUCTASE. NOR : GENE DE REDUCTION DE L'OXYDE NITRIQUE. PON : AZOTE ORGANIQUE PARTICULAIRE.	48
FIGURE 11. PRINCIPALES REACTIONS DU CYCLE DU CARBONE EN DOMAINE HYDROTHERMAL (MADIGAN ET AL., 2008). MODIFIE PAR BYRNE (BYRNE, 2008).	49
FIGURE 12. CYCLE DE CALVIN (MADIGAN ET AL., 2008).	51
FIGURE 13. CYCLE INVERSE DES ACIDES TRICARBOXYLIQUES (CAMPBELL ET AL., 2006)	52
FIGURE 14. OXYDATION AEROBIE DU METHANE PAR LES BACTERIES METHANOTROPHES. LE METHANE EST CONVERTI EN METHANOL PAR LA METHANE MONO OXYGENASE (MMO) A L'AIDE D'ELECTRONS ISSUS DU CYTOCHROME C. LES ELECTRONS OBTENUS AU COURS DES ETAPES SUIVANTES ALIMENTENT LA CHAINE DE TRANSPORT QUI MAINTIEN LA FORCE PROTON-MOTRICE. L'ESSENTIEL DU CARBONE UTILISE POUR LA BIOSYNTHESE PROVIENT DU FORMALDEHYDE (CH ₂ O). Q : QUINONE, CYT : CYTOCHROME (MADIGAN ET AL., 2008).	54
FIGURE 15. PRINCIPALES REACTIONS DU CYCLE DU SOUFRE (MADIGAN ET AL., 2008) MODIFIE PAR BYRNE (BYRNE, 2008).	55
FIGURE 16. OXYDATION DES COMPOSES REDUITS CONTENANT DU SOUFRE. LA VOIE UTILISANT LA SULFITE OXYDASE EST SOUVENT MAJORITAIRE. (MADIGAN ET AL., 2008).	58
FIGURE 17. MOULES <i>BATHYMODIOLUS AZORICUS</i> ET CREVETTES, EDIFICE TOUR EIFFEL, SITE DE LUCKY STRIKE. CAMPAGNE BATHYLUC (2009).	61

FIGURE 18. HYBRIDATION FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> DES ENDOSYMBIOTES DE <i>B. AZORICUS</i> SUR UNE COUPE TRANSVERSALE DE BRANCHE. LES THIOTROPHES APPARAISSENT EN ROSE ET LES METHANOTROPHES EN ORANGE. (A) VUE D'UN FILAMENT. ÉCHELLE = 10 µM. (B) RECONSTITUTION EN 3D D'UNE SECTION DE 10 µM D'UN BACTERIOCYTE (HALARY ET AL., 2008).	63
FIGURE 19. VUE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UN BIOFILM RECOUVRANT UNE PLAQUE D'ACIER D'UN SYSTEME DE TRAITEMENT D'EAU (A GAUCHE) ET D'UN BIOFILM DE STAPHYLOCOQUES SUR DU MATERIEL MEDICAL (A DROITE) (DONLAN, 2002).	65
FIGURE 20. TAPIS MICROBIENS BLANCS PROVENANT DU GOLFE DU MEXIQUE (A GAUCHE). LEVIN, SCRIPPS INSTITUTE OF OCEANOGRAPHY [®] . CAROTTAGE DE SEDIMENT RECOUVERT DE TAPIS MICROBIENS ORANGE ASSOCIES AU VOLCAN DE BOUE NAPOLI, EN MER MEDITERRANEE (A DROITE). IFREMER [®] MEDECO 2007.	71
FIGURE 21. ÉCHANTILLONNAGE D'UN TAPIS MICROBIEN DU VOLCAN DE BOUES MILANO (EST DE LA MEDITERRANEE) AVEC UNE SERINGUE EN TITANE. L'INSERT MONTRE CE MEME TAPIS GROSSIT 400 FOIS PAR MICROSCOPIE PHOTONIQUE (ECHELLE : 5 µM) (HEIJS ET AL., 2005).	72
FIGURE 22. PHOTOGRAPHIES DES COLONISATEURS DEPOSES (RASSA ET AL., 2009).	74
FIGURE 23. HYBRIDATION FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> DES TAPIS MICROBIENS DU SITE 17°S DE L'EPR AVEC UNE SONDE <i>EPSILONPROTEOBACTERIA</i> MARQUEE EN CY3 (A). MEMES IMAGES PAR MICROSCOPIE PHOTONIQUE (B). ÉCHELLE : 20 µM (LONGNECKER AND REYSENBACH, 2001).	75
FIGURE 24. TAPIS MICROBIENS BLANCS ET ORANGE. BASSIN DE GUAYMAS. IFREMER ©.	76
FIGURE 25. OBSERVATIONS <i>IN SITU</i> ET PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DES TAPIS MICROBIENS DU SITE DE KAIKO (A) ET FRYER (B, C ET D). A ET B : ECHELLE D'ENVIRON 0,9 M, LES FLECHES INDIQUENT LES POINTS D'EMISSIONS DU FLUIDE. C ET D : ECHELLE DE 1 µM, LES FLECHES METTENT EN EVIDENCE DES OXYDES DE MANGANESE (KATO ET AL., 2009).	78
FIGURE 26. (A) FILAMENT DE WHITE POINT COLORE EN FITC ET PRESENTANT DE LARGE VACUOLES. ÉCHELLE : 20 µM. (B) FILAMENTS DE WHITE POINT HYBRIDES EN FISH AVEC LA SONDE SPECIFIQUE DE WPF464. ÉCHELLE : 50 µM. (C) OBSERVATION EN MICROSCOPIE D'UN GRAND FILAMENT DE WHITE POINT. ÉCHELLE, 50 µM. (D) OBSERVATION EN MICROSCOPIE DE FILAMENTS FORMANT UNE ROSETTE. BAR, 40 µM (KALANETRA ET AL., 2004).	79
FIGURE 27. ASSEMBLAGES FAUNISTIQUES IDENTIFIES SUR L'EDIFICE DE TOUR EIFFEL:	81
FIGURE 28. PRINCIPE DES CULTURES GELOSEES DEVELOPPEES PAR NELSON. LE MILIEU AVEC AGAR A 0,2 %, DANS LEQUEL SE DEVELOPPENT LES <i>BEGGIATOYA</i> , EST LE CENTRE DE DEUX GRADIENTS INVERSES : O ₂ EN PROVENANCE DE LA PHASE GAZEUSE (BOUCHON POREUX) ET Na ₂ S PROVENANT DU MILIEU AVEC AGAR A 1,5 %.	83
FIGURE 29. PRELEVEMENTS DE TAPIS RECOUVRANT DES MODIOLES AVEC LE PEP.	88
FIGURE 30. SCHEMA DU SYSTEME EXPERIMENTAL MIS EN PLACE.	98
FIGURE 31. REPRESENTATION DES DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE EN GELOSE TESTEES	106
FIGURE 32. ARBRE PHYLOGENETIQUE REPRESENTANT LA POSITION DES SEQUENCES DU GENE CODANT L'ARNr 18S FONGIQUE. L'ANALYSE A ETE REALISEE PAR LA METHODE DU NEIGHBOR JOINING AVEC LA CORRECTION DE KIMURA. LE NOMBRE DE CLONES POUR CHAQUE OTU EST INDIQUE ENTRE PARENTHESE.	170

Liste des tableaux

TABLEAU 1. TYPES DE CHIMIOTROPHIE (JANNASCH AND MOTTL, 1985; MADIGAN ET AL., 2002). LE SIGNE + INDIQUE QUE LE METABOLISME EST ACCESSIBLE A UNE TRES GRANDE DIVERSITE DE PROCARYOTES.....	45
TABLEAU 2. TEMPERATURES, PH ET CONCENTRATIONS EN ΣS ET CH_4 MESUREES OU ESTIMEES AVEC LEUR DEVIATION STANDARD, AU NIVEAU DE DIFFERENTS HABITATS DEFINIS SUR L'EDIFICE DE TOUR EIFFEL (CF. 1.5.4.).....	87
TABLEAU 3. SONDAS FISH UTILISEES.....	91
TABLEAU 4. AMORCES UTILISEES LORS DE L'ETUDE.....	94
TABLEAU 5. SYNOPTIQUE DE LA CULTURE.....	101
TABLEAU 6. MILIEUX DE CULTURE ENSEMENCES LORS DE LA CAMPAGNE MOMAR-08	105
TABLEAU 7. BILAN DES Q-PCR REALISEES.....	164
TABLEAU 8. ENSEMBLE DES CLONES BACTERIENS IDENTIFIES DANS L'APPAREIL DIGESTIF DES MOULES (M) 2, 3, 6 ET 8.	166
TABLEAU 9. SYNTHESE DES CULTURES EN BATCH REALISEES ET RESULTATS OBTENUS.	207

Introduction générale

Les biofilms sont des communautés diverses de micro-organismes adhérant entre eux ainsi qu'à un substrat ; ils forment des structures hétérogènes et complexes que l'on observe dans de nombreux écosystèmes non statiques. Un grand nombre de micro-organismes coopèrent et interagissent de façon complexe dans ces structures, faisant d'elles des modèles intéressants pour l'étude des processus biochimiques comme les cycles élémentaires.

Des biofilms microbiens épais (ou tapis microbiens) ont été observés dans de nombreux écosystèmes océaniques présentant des zones anoxiques. Ces dernières années, un certain nombre d'études moléculaires ont ainsi été réalisées sur les tapis d'écosystèmes chimiosynthétiques telles que les zones de suintement froids (Heijs et al., 2005; Arakawa et al., 2006; Gilhooly et al., 2007; Omoregie et al., 2008) et les grottes sous-marines ou terrestres (Mattison et al., 1998; Engel et al., 2004; Grunke et al., 2010) ; néanmoins, peu de sites océaniques hydrothermaux ont vu leurs tapis microbiens caractérisés (Moyer et al., 1995; Longnecker and Reysenbach, 2001; Davis and Moyer, 2008; Kato et al., 2009; Gerasimchuk et al., 2010). Malgré ce nombre restreint d'études, la présence de tapis microbiens a été observée dans de nombreux sites hydrothermaux. Des tapis composés majoritairement de *Beggiatoa* spp. (ordre des *Thiotrichales*, classe des *Gammaproteobacteria*) ont été rapportés, entre autres, au niveau des zones hydrothermales côtières au large de Kodakara-Jima (Japon) et de Kolbeinsey (Islande) (Hoaki et al., 1995), du rift des Galápagos (Jannasch and Wirsén, 1981), de la dorsale Est-Pacifique (Gaill et al., 1987) et du site hydrothermal de Lucky Strike.

Le site de Lucky Strike est situé le long de la ride Médio-atlantique, sur le point triple des Açores (37,29°N ; 32,28°W), à une profondeur de 1650-1700 mètres. C'est l'un des sites hydrothermaux parmi les plus étendus de ceux ayant été explorés (environ 150000 m²). Les cheminées actives sont distribuées sur les pentes de trois dômes volcaniques qui entourent un lac de lave central ; elles comprennent plusieurs fumeurs noirs actifs délivrant un fluide chaud (324°C), mais aussi des diffuseurs délivrant un fluide de température plus modérée (170°C) (Lee Van Dover et al., 1996; Sarradin et al., 1999). La faune de ce site est dominée par des modioles (*Bathymodiolus azoricus*) qui forment de larges moulières autour des structures actives ou exposées au fluide hydrothermal. Bien que soumis à des variations temporelles, l'environnement de ces bivalves est caractérisé par un pH compris entre 5,9 et

7,3 ainsi que par des concentrations en composés soufrés réduits et méthane permettant une activité chimiosynthétique : 0,8-20 μM ΣS total et 4-9 μM CH_4 (De Busserolles et al., 2009; Cuvelier et al., in press). L'espèce *Bathymodiolus azoricus* est associée à des bactéries endosymbiotiques thiotrophes (oxydant les sulfures) et méthanotrophes (oxydant le méthane) (Duperron et al., 2006).

Les tapis microbiens sont très présents sur le site de Lucky Strike et recouvrent la plupart des moulières ainsi que certaines zones de dépôts hydrothermaux sous l'influence du fluide. Ils sont relativement fins (quelques mm) et composés principalement (d'après les observations microscopiques et à l'œil nu) de filaments blancs attachés à diverses surfaces. Ces filaments, en perpétuelle agitation dans les courants, sont englobés dans une matrice qui maintient une grande diversité morphologique de procaryotes autour d'eux. Le rôle de ces tapis dans l'écosystème hydrothermal est actuellement inconnu et les interactions des populations microbiennes avec la faune sont peu comprises. Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse se proposaient d'identifier – par des approches moléculaires mais également culturelles – les micro-organismes présents et métaboliquement actifs au sein des tapis microbiens de ce site hydrothermal.

Les diversités phylogénétique et fonctionnelle des tapis microbiens de Lucky Strike ont été caractérisées par des méthodes de biologie moléculaire. Une attention particulière a été portée aux populations lithotrophes (oxydation des composés soufrés ou du méthane) et autotrophes (fixation du carbone inorganique). Les symbiontes de *Bathymodiolus azoricus* ont également été recherchés dans les tapis échantillonnés et la communauté microbienne contenue dans la glande digestive de ces modioles a été caractérisée. Les résultats ont été corrélés avec les données environnementales et biologiques connues, ainsi qu'avec les observations réalisées durant ce travail.

Pour le volet cultural, des enrichissements de populations lithoautotrophes ont été réalisés au cours des campagnes MoMAR-08 (2008) et Bathyluck (2009). Cette dernière campagne nous a également permis de réaliser une culture d'enrichissement en fermenteur ciblant les populations sulfo-oxydantes. Un suivi sur une période de 85 jours a été réalisé sur cette culture.

Le chapitre premier du manuscrit est consacré à la définition du contexte de l'étude, à travers la présentation des environnements chimiosynthétiques en tant qu'écosystèmes

propices au développement de tapis microbiens. Les techniques moléculaires et culturales utilisées lors de ce travail de thèse sont ensuite détaillées dans un chapitre de matériels et méthodes. Les résultats sont présentés et discutés sous la forme de deux articles, soumis ou en préparation, auxquels sont joints différents travaux complémentaires. Ces résultats sont ensuite synthétisés et mis en perspectives dans un chapitre de conclusion.

1. Contexte de l'étude

1.1. Les écosystèmes chimiosynthétiques des océans

1.1.1. Des oasis dans le désert ?

L'océan profond est souvent perçu comme un biotope uniforme et abritant une biomasse limitée. Froid (environ 2°C) et dépourvu de lumière, les écosystèmes abyssaux dépendent de l'apport de composés organiques provenant de la zone euphotique, où s'opère la photosynthèse du fait de micro-algues planctoniques unicellulaires tels *Synechococcus* ou *Prochlorococcus* (Partensky et al., 1999). La majeure partie des grands fonds est constituée d'étendues sédimentaires formant, entre 2000 et 6000 mètres de profondeur, la plaine abyssale. Les phénomènes de bioturbation des organismes benthiques ou épibenthiques y entraînent une certaine hétérogénéité et, en dépit de l'apparente continuité de cet environnement, les faunes se différencient selon la profondeur et par régions biogéographiques. Les hétérogénéités environnementales à petite échelle, ainsi que la grande superficie des fonds océaniques, sont invoquées pour expliquer les fortes diversités des faunes présentes, qui sont contrebalancées par des biomasses plutôt faibles (Brusca, 2003 ; Gage and Tyler, 1991).

En 1977, la découverte de luxuriantes communautés animales associées à des sources hydrothermales de la ride des Galápagos a bousculé les conceptions d'alors sur la vie dans les abysses (Corliss and Ballard, 1977; Lonsdale, 1977). Quelques années plus tard, en 1983, des écosystèmes présentant des biomasses aussi importantes furent découverts dans le Golfe du Mexique, autour d'émissions de fluides froids enrichis en méthane (Paull et al., 1984; Juniper and Sibuet, 1987; Sibuet and Olu, 1998). Du fait de leurs fortes biomasses, contrastant avec celles observées dans les plaines abyssales, ces environnements sont considérés comme des oasis de vie sous-marine (Carney, 1994). Les communautés animales qui leurs sont associées montrent différentes particularités biologiques et physiologiques comme la présence d'associations symbiotiques et l'adaptation à des conditions « extrêmes » de pH, de pression, de température, de teneur en métaux et sulfures, etc. Ces écosystèmes présentent un fort endémisme lié à ces contraintes physico-chimiques ; ceci ajoutant encore un élément de contraste avec la faune abyssale jusqu'alors connue (Sibuet and Olu, 1998). Le réseau trophique dans ces environnements présente la particularité de ne pas reposer sur la photosynthèse — l'obscurité règne, — mais sur une production primaire

chimiosynthétique locale. Cette production est réalisée par des micro-organismes autotrophes, capables d'utiliser les composés réduits des fluides pour assurer la fixation du carbone (Jannasch and Nelson, 1984; Jannasch and Mottl, 1985). Ces habitats n'occupent qu'une faible portion des fonds océaniques (Tunnicliffe et al., 2003), mais constituent des écosystèmes originaux en termes d'adaptation des organismes à des conditions extrêmes (Rothschild and Mancinelli, 2001). Les conditions physico-chimiques qui y règnent, conditions considérées par certains auteurs comme analogues à celles de la vie primitive terrestre, renforcent encore l'intérêt de ces écosystèmes et ont grandement participé à l'engouement scientifique pour la frange extrêmophile des procaryotes les peuplant (Prieur, 1997; Rothschild and Mancinelli, 2001). Enfin, ils constituent un cadre idéal pour l'étude des micro-organismes autotrophes, qu'ils soient actifs en tant qu'organismes libres, en association avec la faune, ou bien interagissant avec d'autres espèces au sein d'un tapis microbien.

Les zones d'émissions de fluides hydrothermaux ou de fluides froids ont participé à la création du concept « d'écosystèmes chimiosynthétiques » et en sont les représentants les plus étudiés. Néanmoins, la notion d'écosystème chimiosynthétique a récemment été élargie à différents environnements réducteurs présentant des habitats appauvris en oxygène et enrichis en espèces chimiques réduites. On peut citer les grottes marines et terrestres riches en sulfures (Sarbu et al., 1996; Mattison et al., 1998; Engel et al., 2003), certaines boues côtières, ou encore les écosystèmes marins associés aux bois coulés (Palacios et al., 2006; Pailleret et al., 2007) et aux carcasses de baleines (Smith and Baco, 2003).

1.1.2. Les grottes sous-marines riches en sulfures

Les grottes sous-marines forment des habitats singuliers mais présentant diverses caractéristiques communes : absence de lumière, températures de l'eau et de l'air relativement constantes, faibles apports de matière organique. La plupart sont oligotrophiques et énergiquement dépendantes de sources allochtones (Poulson and Lavoie, 2000; Simon et al., 2008). La faune benthique va ainsi généralement en s'appauvrissant à mesure que l'on s'éloigne de l'entrée de la grotte (Alfreider et al., 2003).

Cependant des ruissellements d'eaux souterraines, voire de véritables sources (Northup and Lavoie, 2001) alimentent une fraction (environ 10%) de ces grottes en sulfure d'hydrogène (H₂S), permettant une production lithoautotrophique de matière organique.

Les communautés microbiennes de ces sites ont fait l'objet d'un certain nombre d'études en raison de leur impact géomicrobiologique (Vlasceanu et al., 2000; Engel et al., 2001) et de leur faculté à alimenter des écosystèmes complexes (Sarbu et al., 1996). Des études isotopiques basées sur le carbone confirment l'importance de l'autotrophie dans ces environnements (Southward et al., 1996). Les conditions physico-chimiques de ces grottes présentent de nombreuses similarités avec celles des écosystèmes hydrothermaux profonds et, comme elles, permettent le développement de populations autotrophes constituant le premier maillon du réseau trophique (Sarbu et al., 1996). La fixation du CO₂ par les tapis microbiens présent dans ces écosystèmes (cf. 1.5.3.1.) est considérée comme un apport nutritionnel signifiant pour la faune (Mattison et al., 1998).

1.1.3. Les écosystèmes associés aux bois coulés et aux carcasses de baleines.

Des études récentes soulignent le caractère ubiquiste de la chimiosynthèse dans les environnements littoraux et profonds, notamment en association avec des substrats organiques massifs tels que les bois coulés ou les carcasses de cétacés (Dubilier et al., 2008). La chute de matière organique dans les fonds abyssaux peut en effet générer une production de composés réduits et créer des microenvironnements appauvris en O₂ ; dans ces zones peuvent alors se mettre en place des communautés lithoautotrophes.

La première carcasse de baleine abritant une activité chimiosynthétique fut découverte accidentellement par des biologistes marins en 1987, lors d'une plongée du sous-marin Alvin (Smith and Baco, 2003). Les os étaient recouverts de tapis microbiens et environnés de moules, rappelant les communautés présentes au niveau des sources hydrothermales et des zones de suintements froids (Fig. 1).



Figure 1. Carcasse de baleine après 18 mois, Bassin de Santa, 1670m (à gauche). Os de baleines recouverts de tapis microbiens (à droite). C. Smith & Mike Degruy, University d'Hawaii[®].
http://www.noc.soton.ac.uk/chess/education/edu_whale.php

Après la chute d'une carcasse de baleine, on distingue trois stades d'activité de la faune environnante (Smith and Baco, 2003) :

- Le stade des charognards mobiles. Moins de 24 h après la chute, les premiers charognards se rendent sur place : requins somnosidés, coryphaenoides, myxines, amphipodes, langoustines, crabes lithodidés, etc. Ce premier stade de décomposition se caractérise par une très forte densité de population et par une faible diversité des espèces.
- Le stade des opportunistes, qui peut durer de quelques mois à quelques années. Il ne reste en général que les os de la baleine, mais la décomposition se poursuit à l'échelle microscopique. La vie se concentre au niveau des os et des sédiments alentours, enrichis en matière organique. Les densités, parfois plus de 45 000 individus/m², sont les plus fortes des écosystèmes abyssaux. Des polychètes et des crustacés opportunistes constituent la faune principale.
- Le stade sulfophile, qui peut durer plusieurs décennies. Le sédiment autour de la baleine est enrichi en matière organique et les os sont recouverts de tapis microbiens, utilisant comme source d'énergie le H₂S produit par les bactéries qui décomposent en anaérobiose les graisses à l'intérieur des os. Cette chimiosynthèse n'est possible que sur les os de baleine suffisamment massifs et riches en graisse pour permettre à la vie de s'y développer. On observe une faune composée de polychètes, de bivalves, de gastéropodes et de vers, comme l'espèce *Osedax*,

signifiant littéralement le dévoreur d'os. Des crustacés et des poissons sont aussi présents sur le site (Smith and Baco, 2003).

Une cinquantaine d'années plus tard, la majorité des os de taille modeste a disparu ; il ne reste que les plus grosses vertèbres et la tête, très riche en graisse. Le processus de décomposition se poursuit lentement, parfois pendant plus d'un siècle après la chute de la carcasse. Ces écosystèmes sont temporaires mais sans cesse renouvelés, comme ceux s'établissant sur les cheminées hydrothermales.

Tout comme les carcasses de baleines, qui offrent de la nourriture à plusieurs centaines d'espèces marines pendant des décennies, les « bois coulés » sont colonisés par une faune luxuriante et diversifiée. La décomposition du bois par des micro-organismes hétérotrophes libère en effet des composés réduits comme du méthane (CH₄) ou du H₂S, à la base d'une activité chimiosynthétique (Palacios et al., 2006; Pailleret et al., 2007). Ces écosystèmes associés aux carcasses et aux bois coulés pourraient constituer des étapes, des tremplins facilitant la dispersion des espèces des écosystèmes chimiosynthétiques tels que les sources hydrothermales et les zones d'émissions de fluides froids, dont la situation géographique est fixe car liée à des conditions géologiques et géochimiques particulières et localisées (Smith and Baco, 2003).

1.1.4. Les zones d'émission de fluides froids

1.1.4.1. Origines du méthane et nature des fluides

Les zones d'émission de fluides froids sont présentes dans des contextes géologiques variés : on les trouve sur les marges continentales actives et passives, mais également dans des lacs ou des rivières (Fig. 2) (Sibuet and Olu, 1998; Sibuet et al., 2002). Ces zones sont des lieux d'expulsion de fluides interstitiels enrichis en méthane. Les fluides émis, à débits généralement lents, ne proviennent pas d'une activité hydrothermale (Tunnicliffe et al., 2003; Henry and Bourlange, 2004). Le méthane peut avoir pour origine la réduction de la matière organique sous l'effet de la température (qui augmente à mesure de son enfouissement sous le sédiment), on parle alors de méthane thermogénique, ou bien être issu de la méthanogenèse biologique réalisée par des populations d'archées méthanogènes

(Jannasch and Nelson, 1984). La cooccurrence des deux origines est possible, comme dans certaines zones du Golfe du Mexique (Sassen et al., 1999; Sibuet et al., 2002; Sager et al., 2003; Sassen et al., 2004). Le méthane gazeux généré peut ensuite remonter à travers le sédiment ou bien être immobilisé, dans certaines conditions de température et de pression, sous forme d'hydrates de gaz. Ces hydrates constituent le plus important réservoir sous-marin de méthane.

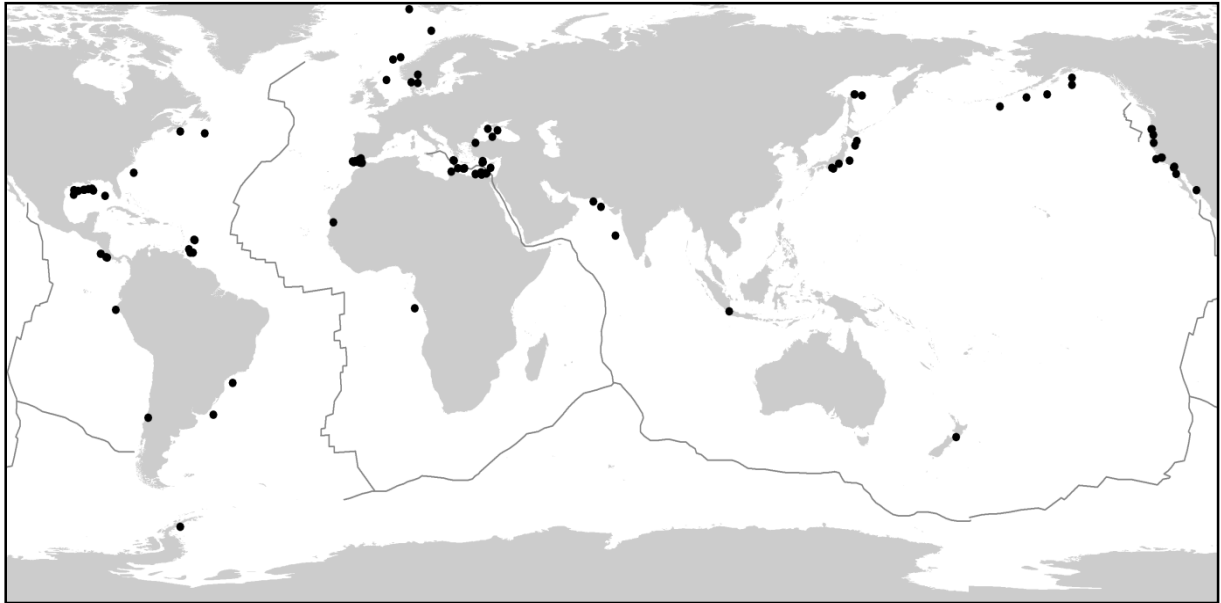


Figure 2. Principales zones d'émissions de fluides froids dans le monde (Ritt 2010).

On peut observer divers types de structures géologiques au niveau des zones d'émission de fluides, en fonction de la nature des flux et des caractéristiques des sédiments. Des volcans de boue, caractérisés par un centre actif à partir duquel des fluides riches en gaz et de la boue sont expulsés (Sager et al., 2003) ont été identifiés au niveau de la marge Norvégienne (Haakon Mosby) et de l'Est de la ride Méditerranéenne. L'autre type de structure : « le pockmark », correspond à une dépression locale du fond océanique résultant de phénomènes de dégazage des fluides en profondeur. On sait peu de choses sur la durée de vie de ces sites, mais en raison du contexte tectonique (non associé à l'accrétion le long des dorsales), on la suppose plus longue que celle des sites hydrothermaux.

Les fluides émis peuvent être hypersalins et contenir, en dehors du méthane, divers hydrocarbures et gaz. Ils peuvent notamment être enrichis en H₂S issu de la réduction des

sulfates. Ce phénomène de sulfato-réduction peut être couplé à l'oxydation anaérobie du méthane (AOM) réalisée par des consortia microbiens qui associent des archées méthanotrophes et des bactéries sulfato-réductrices (Borowski et al., 1999; Boetius et al., 2000a).

1.1.4.2. Biotope observé

Des communautés chimiosynthétiques importantes et diversifiées utilisent le méthane et l'H₂S libérés comme source d'énergie (Fig. 3). Des tapis microbiens denses et épais sont généralement présents au dessus des zones d'émissions d'hydrocarbures et de H₂S ou bien dans la zone oxygénée des sédiments (cf. 1.5.3.3.). La quasi-totalité des phylums marins est représentée dans la faune des sources froides (Sibuet and Olu, 1998; Levin and Mendoza, 2007). Cette faune est dominée par les bivalves, notamment par les mytilidés et les vésicomydés, ainsi que par les polychètes siboglinidés associés en symbiose avec des bactéries lithotrophes. D'autres groupes, comme les spongiaires, les gastéropodes ou les crustacés, peuvent aussi être abondants. La biomasse de cette mégafaune excède largement celle des sédiments environnants (Sibuet and Olu, 1998). La mégafaune symbiotique génère aussi une importante complexité de l'habitat (engineering-species) et favorise la diversité des espèces accompagnatrices (Levin and Mendoza, 2007).

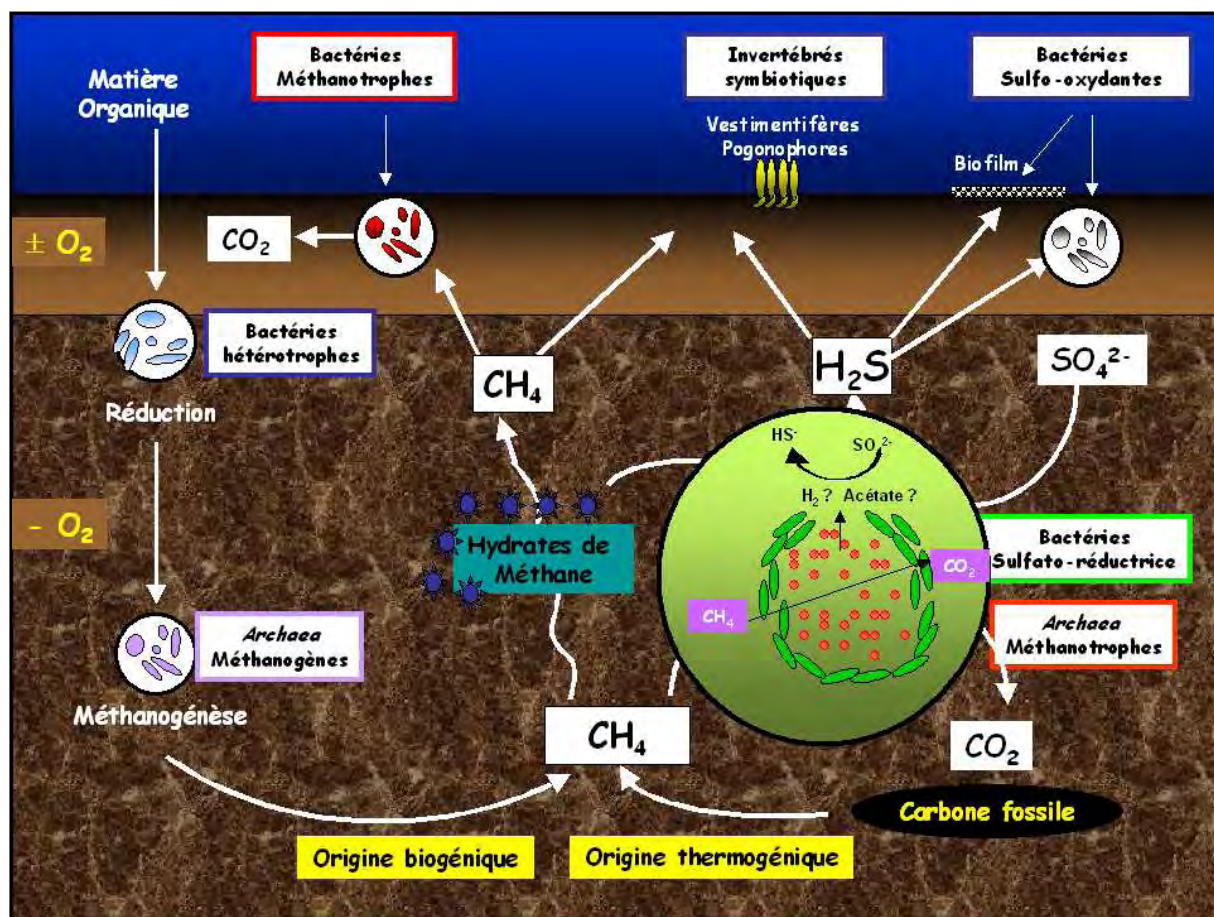


Figure 3. Représentation schématique des principaux processus microbiens se déroulant dans les sédiments marins des zones d'émissions de fluides froids riches en méthane et en hydrogène sulfuré. Thierry Nadalig et Sébastien Dupérron (Duperron 2005), modifié par Cassandre Lazar (Lazar, 2009).

1.1.5. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds

1.1.5.1. Le phénomène hydrothermal

Les sources hydrothermales océaniques profondes (700 à 4000 m sous la surface de la mer) sont localisées le long des dorsales médio-océaniques de l'Atlantique, du Pacifique et de l'océan Indien, ainsi qu'au niveau des bassins avant et arrière-arcs, en contexte de volcanisme de point chaud (Van Dover, 2000) (Fig. 4). Ces environnements sont liés à l'activité volcanique et aux mouvements tectoniques qui, altérant la croûte océanique, génèrent des failles et anfractuosités permettant à l'eau de mer, dense et froide, de s'infiltrer sur plusieurs kilomètres (Edmond et al., 1982). À l'approche de la chambre magmatique, l'eau va se réchauffer, entraînant la diminution de sa densité et sa remontée du fait de la pression générée. En lessivant les roches lors de cette remontée, le fluide va se

charger en éléments métalliques (Zn, Mn, Fe, Si, etc.) et en gaz dissous (H_2S , H_2 , CH_4 , CO , CO_2 , etc.), s'appauvrir en oxygène ainsi qu'en divers composés (Mg^{2+} , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{2-} , etc.) et généralement s'acidifier. La composition du fluide hydrothermal varie en fonction de la nature des roches traversées ; son débit ainsi que sa température sont également variables d'un site à l'autre et même d'un point d'émission à l'autre, en fonction du degré de mélange avec l'eau de mer. Au point où jaillit le fluide se forme une source hydrothermale, unique de part les conditions physico-chimiques y régnant (Baross and Deming, 1985; Jannasch and Mottl, 1985; Erauso, 1994).

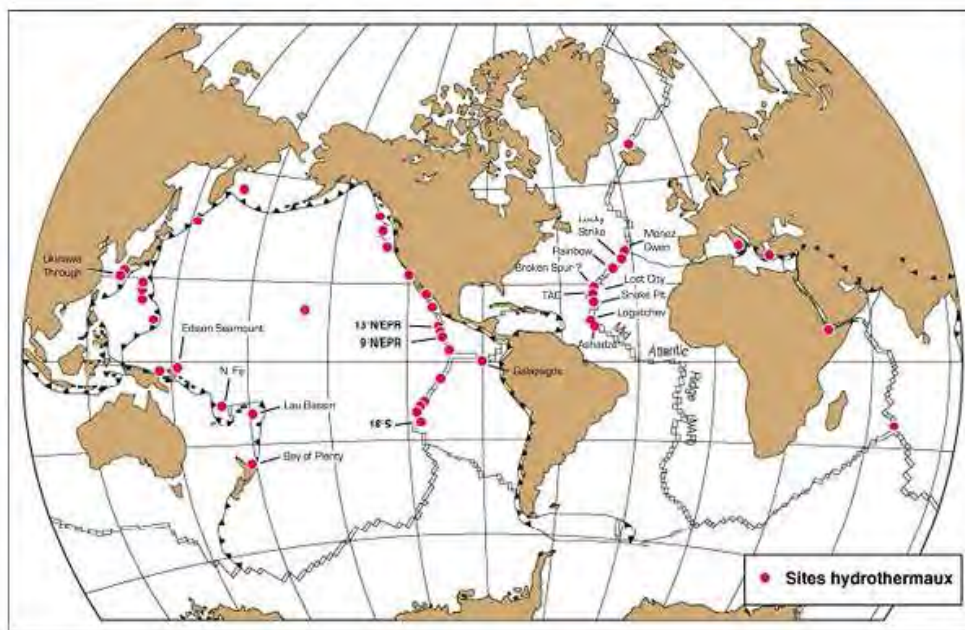


Figure 4. Localisation des dorsales océaniques et des sites hydrothermaux marins étudiés.

<http://www.ifremer.fr/droep/n-sites-hydro.html>

1.1.5.2. Les édifices hydrothermaux

Au contact de l'eau de mer, froide, oxygénée et légèrement alcaline, les fluides hydrothermaux, surchauffés et fortement réduits, génèrent des précipités de sulfures polymétalliques et de sulfates de calcium qui forment des édifices minéraux (Fig. 5). Les caractéristiques de l'édifice formé dépendent du degré de dilution du fluide avec l'eau de mer :

- Lorsque le fluide hydrothermal ne subit pas de dilution avant son émission, il est émis rapidement ($0,7\text{-}2,4 \text{ m s}^{-1}$) et à des températures élevées ($350\text{-}400^\circ\text{C}$). Son mélange

avec l'eau de mer froide provoque la précipitation des minéraux en solution qui forment des cheminées hydrothermales ou « fumeurs noirs ». Présentant de nombreux canaux et cavités, ces structures répondent de manière dynamique aux changements de température, de débit et de composition chimique du fluide, par des modifications de minéralogie et de forme.

- Lorsque le fluide est légèrement dilué avant son émission et que sa température est un peu moins élevée ($< 280^{\circ}\text{C}$), des diffuseurs ou « fumeurs blancs » peuvent se former (Fouquet et al., 1988). Ces édifices ne possèdent pas de conduit interne : le fluide diffuse à faible vitesse ($10\text{-}15 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) directement à travers la paroi, par un réseau complexe de petits canaux.
- Au niveau des « pillow lava » le fluide peut également diffuser à très faible vitesse ($0,5 \text{ à } 2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) à une température comprise entre $6 \text{ et } 23^{\circ}\text{C}$.

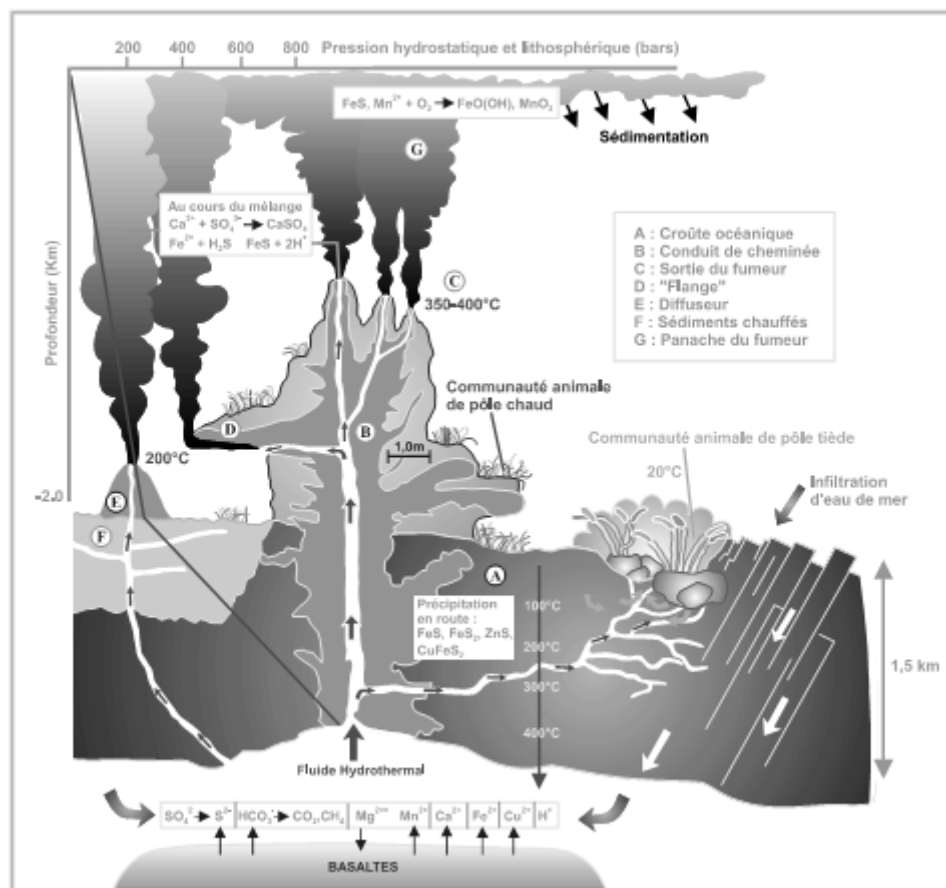


Figure 5. Représentation schématique des sources hydrothermale océaniques (Baross and Deming, 1985; Erauso, 1994)

1.1.5.3. Les sources hydrothermales de l'Atlantique

Sur une longueur totale de 60000 km, seules quelques centaines de kilomètres de dorsales ont été explorées et de nombreux sites restent à découvrir. Les sites du Pacifique ont été les plus visités alors que ceux de la ride Médio-atlantique (MAR) l'ont été plus tardivement. En effet, l'expansion lente (1 à 2 cm par an contre 18 cm sur les dorsales du Pacifique) ne laissait pas présager un hydrothermalisme actif. L'exploration de cette dorsale océanique a débuté en 1985 et est restreinte à une section limitée par la zone « Vema fracture » (11°N) au Sud, et par le plateau des Açores (38°N) au Nord, avec pour exception quelques zones actives décrites à la périphérie de l'Islande (Fricke et al., 1989). Depuis 1985, une quinzaine de sites actifs ont été étudiés sur la MAR (Fig. 6). Ces zones présentent des conditions environnementales très différentes les unes des autres. Ces différences sont liées aux variations de profondeurs observées et à la nature des roches. Les zones les plus profondes (> 3000 m) sont relativement stables ; une activité hydrothermale de 26000 ans a ainsi été rapportée pour le site de TAG. Au contraire, les zones situées à moins de 3000 m de profondeur, en particulier Rainbow et Menez-Gwen, sont instables dans le temps et l'espace (Desbruyères et al., 2000). Le fer et le manganèse sont les métaux de transition les plus abondants ; des fluides en contiennent peu (Menez-Gwen, Lucky Strike), mais d'autres en présentent des taux élevés (Rainbow, TAG). La plupart des sites hydrothermaux de la MAR reposent sur une sous-couche basaltique. Seulement trois sites reposent sur des roches ultramafiques du manteau terrestre : Logatchev (14°45' N) découvert en 1993-94 (Bogdanov et al. 1995), Rainbow (36°14'N) découvert en 1997 (Fouquet et al., 1997) et Ashadzé (campagne Serpentine, 2007). Les fluides de ces sites présentent des concentrations en hydrogène, méthane et fer élevées par rapport aux fluides issus de basaltes, mais sont appauvris en sulfures (Charlou et al., 2002; Douville et al., 2002).

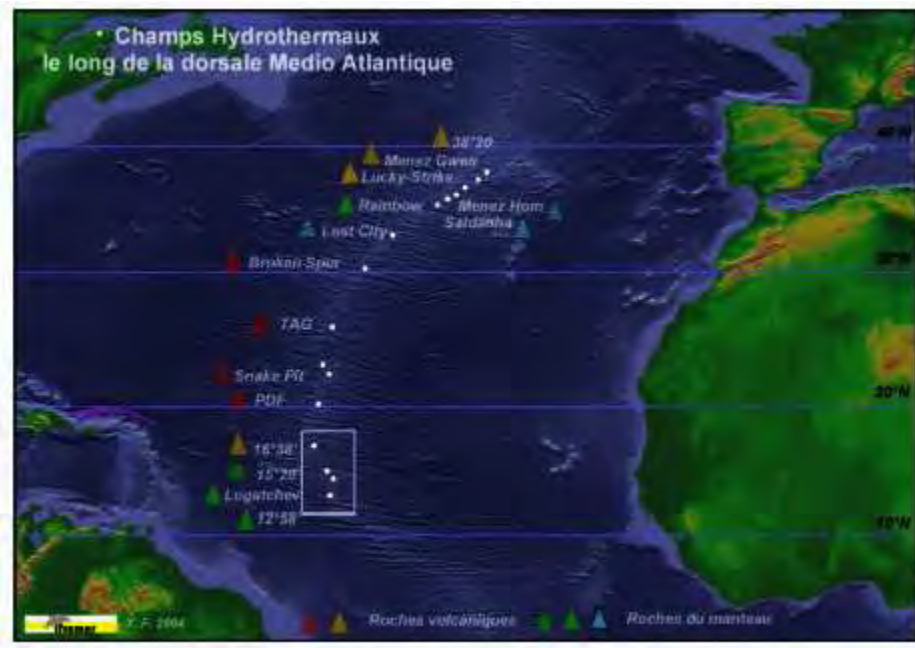


Figure 6. Fig. Champs hydrothermaux le long de la dorsale Médio-atlantique, Ifremer[®].

1.1.5.4. Le site de Lucky Strike

Le site de Lucky Strike, découvert en 1992 lors de la campagne américaine FAZAR, est situé sur le point triple des Açores (37,29°N ; 32,28°W) à une profondeur de 1650-1700 mètres ; très étendu, il couvre une surface d'environ 150000 m².

Les cheminées actives sont distribuées sur les pentes de trois dômes volcaniques qui entourent un lac de lave central ; elles émergent d'une zone de débris hydrothermaux ou volcaniques et comprennent plusieurs fumeurs noirs actifs délivrant un fluide chaud (324°C), mais aussi des diffuseurs délivrant un fluide de température plus modérée (170°C) (Lee Van Dover et al., 1996; Sarradin et al., 1999).

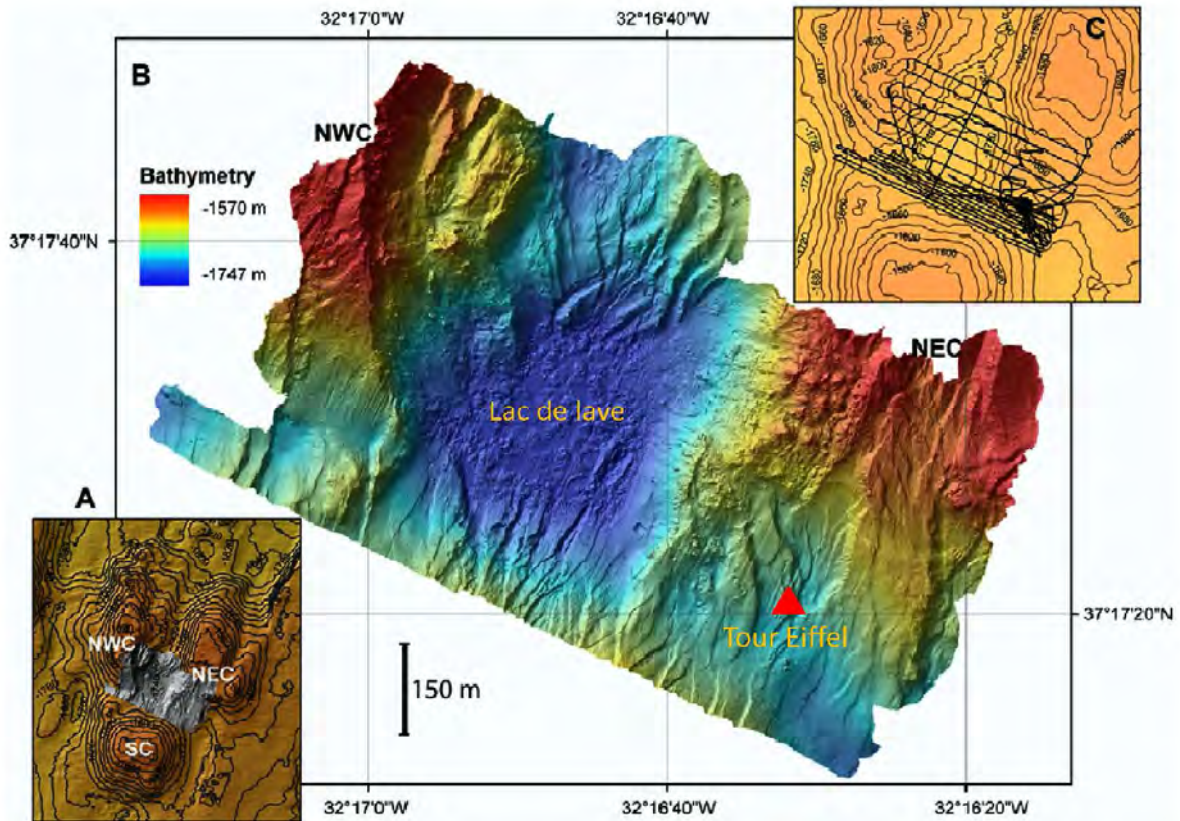


Figure 7. Carte (A) et bathymétrie haute résolution (B) du champ hydrothermal de Lucky Strike. Circuit du ROV Victor 6000 durant la bathymétrie (C). NWC: Northwest volcanic Cone; NEC: Northeast volcanic Cone; SC: South volcanic Cone. Modifié d'après Ondreas (Ondreas et al., 2009).

L'édifice actif le plus visité et étudié est la cheminée « Tour Eiffel », située au Sud-est du site, entre deux cônes volcaniques. Tour Eiffel forme une structure de 12 m de haut dont la faune est considérée comme représentative de l'ensemble du site de Lucky Strike (Fig. 7). Les fluides hydrothermaux qui y sont expulsés affichent des températures comprises entre 170 et 324°C, et sont relativement pauvres en H₂S (2100 à 2500 µM) ; le rapport CH₄/ΣS est l'un des plus faibles des sites hydrothermaux de l'Atlantique. Pauvre en métaux par rapport aux sites comme Rainbow ou TAG, le fluide pur de Tour Eiffel contient des concentrations de fer allant de 595 à 704 µM.

1.2. Les communautés microbiennes des écosystèmes hydrothermaux océaniques

1.2.1. Types d'habitats microbiens et communautés associées

Les environnements hydrothermaux sont des écosystèmes dynamiques résultant du mélange turbulent entre le fluide hydrothermal, chaud et anoxique, avec l'eau de mer environnante, froide et oxygénée. Ils sont caractérisés par des gradients physico-chimiques abrupts (à l'échelle du centimètre) et sont instables aussi bien dans le temps que dans l'espace. En dépit de ces paramètres, différents types d'habitats des communautés microbiennes ont été définis (Karl, 1995) :

- le fluide hydrothermal, où se développent des populations microbiennes sous forme libre ou bien attachées à des particules ; ces populations pourraient être issues d'une biosphère souterraine sous-jacente aux cheminées hydrothermales (Gold, 1992; Takai et al., 2004b; Roussel et al., 2008) ;
- les surfaces des dépôts hydrothermaux, des sédiments, ainsi que des animaux exposés aux fluides peuvent être le support du développement de micro-organismes, notamment sous la forme de biofilms ou tapis microbiens ;
- le panache, correspondant à l'eau de mer enrichie par les minéraux présents dans les fluides ;
- la faune hydrothermale (syboglinoïdés, polychètes, mollusques, crustacés), qui peut être associée à des micro-organismes pour former des ectosymbioses, des endosymbioses, ou des épibioses ;
- les édifices hydrothermaux actifs, de structure poreuse et organisés en strates, qui abritent aussi bien des micro-organismes hyperthermophiles que mésophiles car présentant des gradients de température très importants ;
- les sédiments des champs hydrothermaux au travers desquels percole le fluide hydrothermal.

Cette typologie, bien que théorique – les micro-organismes n'étant pas obligatoirement inféodés à un seul type d'habitat, – permet d'orienter les stratégies d'échantillonnage et de décrire la structure spatiale des peuplements microbiens.

1.2.2. La diversité microbienne

L'étude de la diversité des communautés microbiennes a connu ces 20 dernières années un essor considérable grâce au développement des techniques de biologie moléculaires qui ont permis de s'affranchir des contraintes culturelles. De nombreux inventaires moléculaires basés sur le gène codant l'ARN ribosomal 16S ont été réalisés sur un panel varié d'échantillons hydrothermaux. Les communautés microbiennes associées à différents types d'habitats ont ainsi été décrites : celles des cheminées actives ou non (Muyzer et al., 1995; Takai and Horikoshi, 1999; Takai et al., 2001; Schrenk et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Schrenk et al., 2008), celles des sédiments hydrothermaux (Teske et al., 2002), celles associées au fluide hydrothermal (Huber et al., 2002b; Huber et al., 2003), la microflore associée à des échantillons animaux (Polz and Cavanaugh, 1995; Dubilier et al., 2008; Durand et al., 2010), ou encore la microflore des tapis microbiens (Moyer et al., 1994; Moyer et al., 1995; Moyer et al., 1998; Longnecker and Reysenbach, 2001; Teske et al., 2002; Moussard et al., 2006; Kato et al., 2009; Gerasimchuk et al., 2010) (cf. 1.5.3.4.).

Ces inventaires moléculaires ont révélé une très grande diversité de micro-organismes, au sein des *Bacteria* comme des *Archaea*. Les différents habitats, ainsi que les conditions physico-chimiques et géologiques particulières à chaque site, autorisent en effet une importante diversité de métabolismes, de tolérances à l'oxygène ou de préférences de température et de pH.

Les analyses phylogénétiques portant sur les communautés archéennes ont révélé la présence, dans les cheminées hydrothermales, d'une importante diversité d'archées affiliées aux ordres *Thermococcales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Archaeoglobales*, *Desulfuroccales* et *Ignococcales* (Takai and Horikoshi, 1999; Reysenbach et al., 2000; Takai et al., 2001; Huber et al., 2002b; Nercessian et al., 2003; Schrenk et al., 2003; Nercessian et al., 2004), mais également d'archées appartenant à des lignées pour lesquelles il n'existe aucun représentant cultivé comme les *Korarchaeota*.

Les communautés bactériennes colonisent de nombreuses niches de l'écosystème hydrothermal. De façon remarquable, les *Epsilonproteobacteria* sont dominantes dans la plupart des études de diversité bactérienne, que ce soit au niveau des zones de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer (Reysenbach et al., 2000; Corre et al., 2001;

Huber et al., 2003), les sédiments hydrothermaux (Teske et al., 2002) et les tapis microbiens (Moyer et al., 1995; Taylor et al., 1999; Longnecker and Reysenbach, 2001; Moussard et al., 2006). Des *Epsilonproteobacteria* ont également été détectées en associations épisymbiotiques avec des métazoaires (Polz and Cavanaugh, 1995; Cary et al., 1997; Durand et al., 2010). Plus généralement le phylum des *Proteobacteria* est très présent dans les banques de clones construites, même si la diversité des micro-organismes hydrothermaux océaniques est répartie dans presque tous les phyla identifiés à ce jour. Il ne semble donc pas y avoir une spécificité hydrothermale au niveau des phyla. Néanmoins, certaines séquences forment des lignées bien individualisées qui semblent être inféodées à ces écosystèmes. La diversité bactérienne comprend ainsi, outre les *Proteobacteria*, des espèces des groupes des *Aquificales*, des *Firmicutes*, des *Verrumicrobia*, des *Thermales*, des *Deferibacterales* et des *Bacteroidetes*. Des clones proches de bactéries vertes non-sulfureuses ont également été mis en évidence ou identifiés (Alain et al., 2002a; Lopez-Garcia et al., 2002; Teske et al., 2002).

1.2.3. Rappels de quelques notions sur les métabolismes bactériens

La chimiotrophie est le type métabolique des organismes tirant leur énergie de l'oxydation de composés réduits; ce terme s'oppose à la phototrophie. On parle d'organismes chimiotrophes pour désigner les êtres vivants possédant ce métabolisme.

On distingue parmi les chimiotrophes les organismes organotrophes, dont le catabolisme est basé sur l'oxydation des composés organiques et les lithotrophes, qui tirent leur énergie (catabolisme) de l'oxydation de composés inorganiques réduits: fer (Fe^{2+}), ammonium (NH_4^+), hydrogène sulfuré (H_2S), etc. Une seconde distinction peut être faite entre les autotrophes, qui utilisent des sources de carbone inorganique (CO_2 , CO , CH_4) pour synthétiser leur propre matière (anabolisme) et les hétérotrophes, qui ont besoin d'une source de carbone organique (Fig. 8).

Les micro-organismes lithoautotrophes, qui nous intéressent particulièrement ici, utilisent l'énergie chimique provenant de l'oxydation de composés inorganiques réduits et génèrent leur propre matière à partir de carbone inorganique.

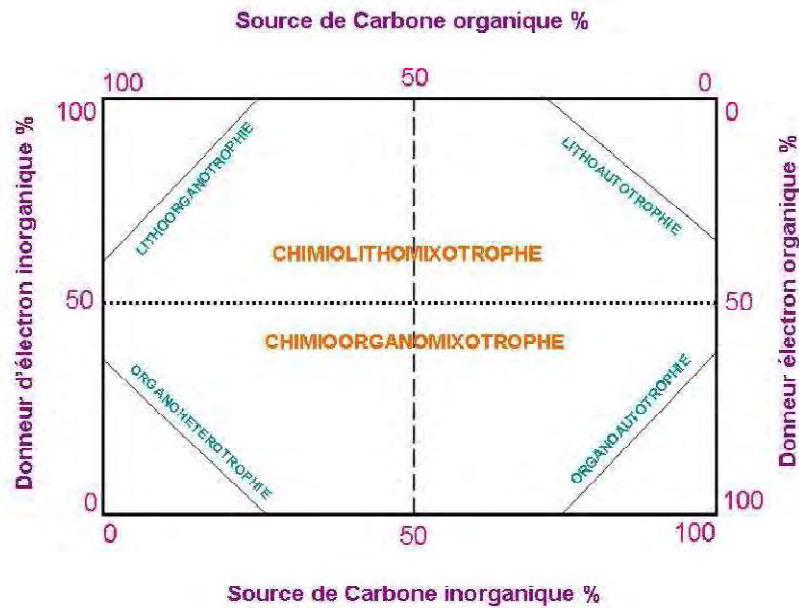


Figure 8. Diversité des métabolismes chimiotrophes. La croissance des procaryotes en fonction des donneurs d'électrons organiques ou inorganiques est exprimée comme des pourcentages variables d'énergie totale et de carbone nécessaire. Modifié par Byrne (Byrne, 2008) d'après (Karl, 1995).

1.2.4. Les micro-organismes à la base du réseau trophique

La production primaire photosynthétique de surface a un impact extrêmement faible en profondeur : moins de 5% du carbone issu de la photosynthèse atteint les eaux situées au-delà de 2000 m de profondeur (Suess, 1980) et la majeure partie du carbone organique dissous présent à ces profondeurs est constituée de composés organiques peu labiles et difficilement assimilables (Karl, 1995). La biocénose des écosystèmes hydrothermaux profonds est donc principalement basée sur la chimiosynthèse bactérienne, c'est-à-dire sur l'assimilation de carbone minéral grâce à de l'énergie chimique (oxydoréduction) et non lumineuse (Jannasch and Wirsén, 1979; Jannasch and Nelson, 1984). Le biotope hydrothermal permet en effet la coexistence de nombreux métabolismes basés sur la chimiosynthèse : l'eau de mer, oxydée, est riche en accepteurs d'électrons potentiels (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , etc.), alors que les fluides hydrothermaux sont riches en gaz réduits et dissous (H_2 , CH_4 , H_2S , etc.) qui constituent de potentiels donneurs d'électrons. Les micro-organismes lithotrophes utilisent l'énergie chimique provenant de ces couples d'oxydoréduction (Fig. 9). Cette production primaire bénéficie aux autres organismes, soit directement par le biais d'associations étroites avec des invertébrés, soit lors de l'utilisation par les consommateurs primaires.

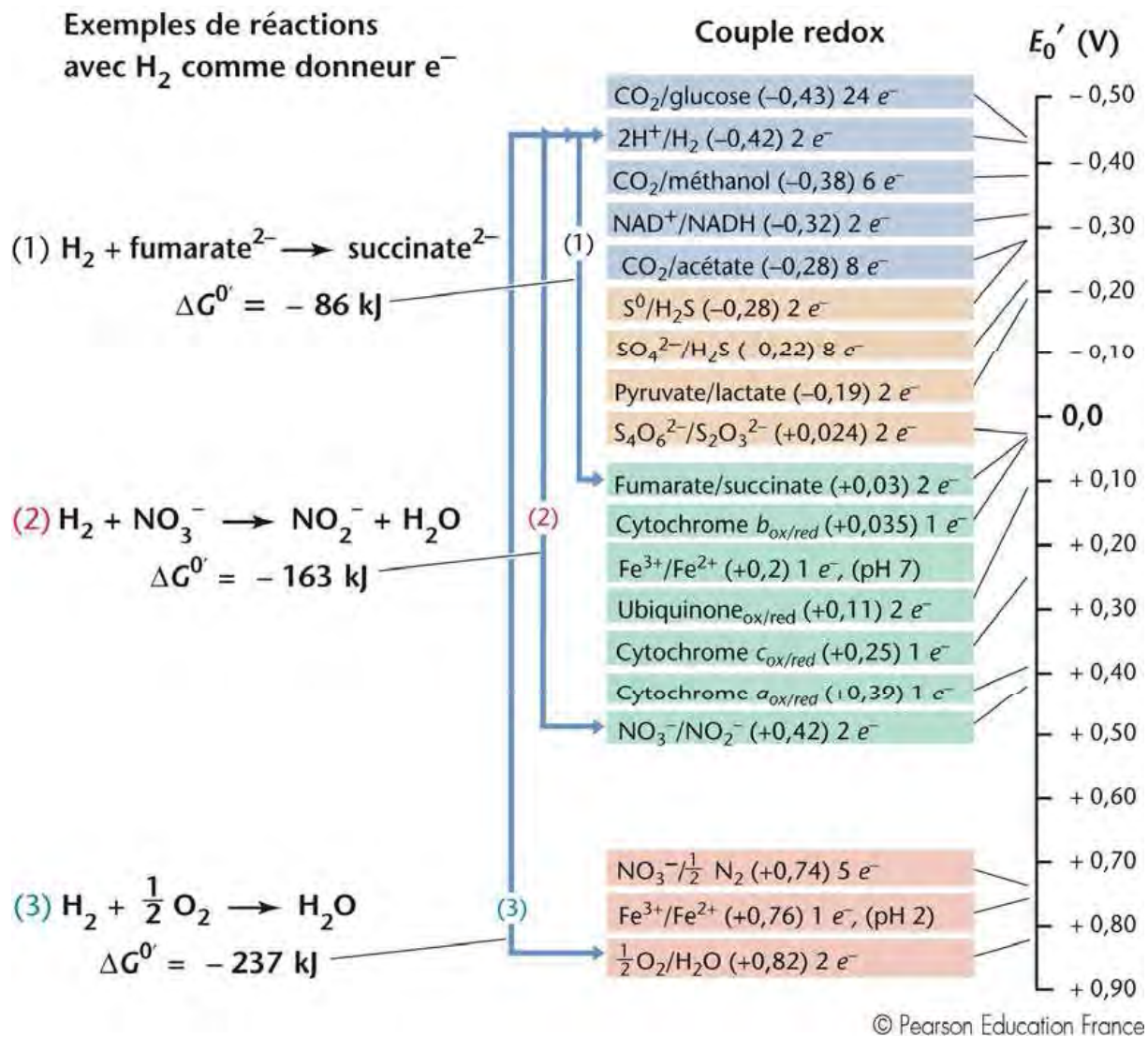


Figure 9. Principaux couples d'oxydoréduction (Madigan and Martinko, 2007)

Cette hypothèse n'a néanmoins pas été validée formellement pour l'instant (Karl, 1995) mais semble très probable compte tenu des connaissances actuelles de cet écosystème et de l'isolement d'un grand nombre de micro-organismes lithoautotrophes aux exigences et aux préférences variés. Des résultats de mesures d'activités et de concentrations d'ATP corroborent également cette hypothèse (Karl, 1980; Karl, 1995). Il faut néanmoins garder à l'esprit que la production microbienne autotrophe issue de respirations aérobies ou micro-aérophiles n'est pas à proprement parler une production primaire, car l'oxygène utilisé comme accepteur terminal d'électrons est un produit de la photosynthèse.

Des hypothèses alternatives à celle d'une production primaire bactérienne par lithoautotrophie sont également plausibles et pourraient expliquer, du moins en partie, les densités animales observées au niveau des sources hydrothermales océaniques (Karl, 1995). La première de ces hypothèses est celle d'une synthèse chimique thermocatalytique de matière organique et de son utilisation à basse température par des micro-organismes organohétérotrophes. Des réactions abiogéniques (Fischer-Tropsch, par exemple) pourraient conduire à la formation de composés organiques tels que des acides gras ou des hydrocarbures (Holm and Charlou, 2001; Charlou et al., 2002); la synthèse de sucres et d'acides aminés à partir de paraformaldéhyde et d'urée a ainsi pu être réalisée sur des roches dépourvues de matière organique provenant de la dorsale Médio-atlantique (Degens, 1974). Les molécules organiques synthétisées pourraient soit être utilisées directement par des micro-organismes organohétérotrophes, soit se polymériser en composés plus complexes et être consommées par la microflore. D'autre part, l'hypothèse d'une altération par la température de la matière organique dissoute ou sédimentée à partir de la surface, en des formes non réfractaires et utilisables par la microflore, peut être avancée.

La synthèse de matière organique en milieu hydrothermal pourrait donc résulter d'une contribution simultanée, en proportions différentes et variables d'un site à l'autre, des mécanismes liés à ces différentes hypothèses : lithoautotrophie, synthèse chimique et pluie sédimentaire de carbone organique.

1.3. Diversité des métabolismes dans les écosystèmes hydrothermaux

1.3.1. Métabolismes microbiens attendus dans les écosystèmes hydrothermaux

Les voies métaboliques susceptibles d'être utilisées par les micro-organismes des sources hydrothermales océaniques profondes sont listées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Pour chaque voie métabolique les principaux groupes microbiens impliqués sont mentionnés. Des isolats venant d'environnements hydrothermaux ont été obtenus pour chacune des voies métaboliques listées, à l'exception de l'oxydation anaérobie du méthane (AOM) et de l'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox). Des signatures moléculaires correspondant à des espèces microbiennes réalisant ces deux métabolismes, ainsi que des mesures d'activité ont néanmoins été détectées à Lucky Strike (Byrne et al., 2008) pour anammox et à Guaymas (Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2005) ainsi qu'à Lost City (MAR) pour l'AOM (Schrenk et al., 2004; Brazelton et al., 2006).

Tableau 1. Types de chimiotrophie (Jannasch and Mottl, 1985; Madigan et al., 2002). Le signe + indique que le métabolisme est accessible à une très grande diversité de procaryotes.

Métabolisme	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Sources de carbones	organismes	Groupes représentatifs
Autolithotrophe	H ₂	O ₂	CO ₂	hydrogène- oxydants	<i>Proteobacteria</i> , Gram positives, <i>Aquifex</i>
	S ²⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	O ₂	CO ₂	Sulfo-oxydants	<i>Proteobacteria</i>
	Fe ²⁺ , Mn ²⁺	O ₂	CO ₂	Fer et manganèse oxydants	<i>Proteobacteria</i>
	NH ₄ ⁺ , NH ₃ , NO ₂ ⁻	O ₂	CO ₂	Nitrifiants	<i>Proteobacteria</i> , <i>Nitrospira</i>
	CH ₄ , CO, composés en C1	O ₂	CO ₂ , composés en C1	Méthanotrophes et méthylotrophes	<i>Gamma-</i> (Type I) et <i>Alpha-</i> (Type II) <i>proteobacteria</i>
	H ₂	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrifiants	+
	H ₂	S ⁰ , SO ₄ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	CO ₂	Sulfo, sulfato et thiosulfato-réducteurs	<i>Deltaproteobacteria</i> et Firmicutes
	H ₂	CO ₂	CO ₂	Méthanogènes et acétogènes	Archées méthanogènes
	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻ , (NO ₃ ⁻ , Fe ³⁺ ?)	CO ₂	Oxydant l'ammonium en anaérobie	<i>Planctomycetes annamox</i>
	Hétérotrophe	[CH ₂ O] _n	O ₂	[CH ₂ O] _n	Hétérotrophes aérobies
[CH ₂ O] _n		NO ₃ ⁻	[CH ₂ O] _n	Dénitrifiants	+
[CH ₂ O] _n		Fe ³⁺ , Mn ²⁺	[CH ₂ O] _n	Ferro-réducteurs	<i>Deferribacter</i> , <i>Geovibrio</i>
[CH ₂ O] _n		S ⁰ , SO ₄	[CH ₂ O] _n	Sulfure et sulfato-réducteurs	<i>Deltaproteobacteria</i>
[CH ₂ O] _n		[CH ₂ O] _n	[CH ₂ O] _n	Hétérotrophes aérobies et bactéries fermentatrices	<i>Proteobacteria</i> , gram positives, <i>Thermotoga</i> , +

1.3.2. Le cycle du fer

Le fer (Fe) joue un rôle clé dans certains métabolismes aérobies et anaérobies ; c'est aussi un composant essentiel des cytochromes, des protéines fer-soufre (ferrédoxines) et de certaines enzymes telles que les catalases, peroxydases, oxygénases. En milieu hydrothermal les métaux ont de plus un rôle dans la formation des cheminées. Deux réactions principales composent le cycle du fer : l'oxydation du fer ferreux (Fe²⁺) et la réduction du fer ferrique (Fe³⁺) :

- Le fer ferreux (Fe II) est utilisé comme donneur d'électrons par les micro-organismes ferro-oxydants aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies. Divers procaryotes, tels que les *Beta* et *Gammaproteobacteria* lithoautotrophes oxydent ces ions Fe^{2+} mais également les ions Mn^{2+} ; on peut citer les genres *Gallionella*, *Leptothrix* et *Sphaerotilus*, entre autres. Ces bactéries peuvent avoir localement une influence sur leur milieu (bio-engineering) en catalysant la précipitation d'oxydes (Nealson, 1997; Emerson and Moyer, 2002). En milieu hydrothermal, certaines archées hyperthermophiles ferro-oxydantes, comme *Ferroglobus placidus*, ont également été isolées (Hafenbradl et al., 1996). Des études récentes ont mis en évidence des micro-organismes ferro-oxydants associés à la crevette *Rimicaris exoculata* et induisant la formation de dépôt d'oxyde de fer dans la cavité branchiale de l'animal (Zbinden et al., 2008; Durand et al., 2010).
- Le fer ferrique (Fe III) est utilisé comme accepteur terminal d'électrons dans des conditions d'anoxie par de nombreux micro-organismes organotrophes et lithotrophes ferro-réducteurs. Parmi les micro-organismes isolés d'écosystèmes marins et formellement décrits on trouve des archées (*Archaeoglobales*, *Thermococcales*, etc.) et des bactéries (*Thermotogales*, *Deferribacter*, etc.) thermophiles, psychrophiles, acidophiles et alcalinophiles (Jannasch and Mottl, 1985; Vargas et al., 1998; Lovley et al., 2004).

1.3.3. Le cycle de l'hydrogène

L'importance du dihydrogène (H_2) comme donneur d'électrons est connu (Jannasch and Mottl, 1985; Alain et al., 2003; Postec et al., 2005a). Le dihydrogène est également un élément clé de l'activité des monooxygénases (méthane, ammonium) et de la méthanogenèse (Nealson, 1997). En limitant la dépurination de l'ADN ou la racémisation des acides aminés, ce gaz pourrait enfin jouer un rôle dans la résistance des micro-organismes aux conditions extrêmes (Morita, 1999).

Principalement apporté par les fluides hydrothermaux, l' H_2 est très abondant en contexte de substrat ultrabasique comme sur le site Rainbow (Charlou et al., 2002). Il est aussi produit

par de nombreux procaryotes lors de processus de fermentation par le biais d'hydrogénases intra ou extracellulaires (Morita, 1999).

1.3.4. Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote apparaît complet au niveau des sources hydrothermales (Fig. 10). Des bactéries et archées possèdent les gènes codant le complexe de la nitrogénase et catalysent la transformation du diazote en ammonium (Mehta et al., 2003) ; d'autres possèdent le gène codant la nitrite réductase et catalysent la transformation du nitrite en ammonium (Braker et al., 2000). L'utilisation du nitrate comme accepteur d'électrons par de nombreuses bactéries est avéré. Ces micro-organismes catalysent la transformation en anaérobiose du nitrate en nitrite grâce à la nitrate réductase (Nealson, 1997). La connaissance de ces micro-organismes et la compréhension de ce cycle ont largement progressé ces dernières années avec les découvertes successives des phénomènes d'oxydation anaérobie de l'ammonium –anammox– et d'oxydation aérobie de l'ammonium. Le phénomène anammox a été mis en évidence dans des panaches hydrothermaux (Lam et al., 2004) ainsi sur plusieurs sites hydrothermaux de la dorsales Médio-atlantique dont le site Lucky Strike (Byrne et al., 2008). Les bactéries responsables de ce processus forment un groupe distinct au sein du phylum des *Planctomycetes*. L'oxydation aérobie de l'ammonium est, elle, le fait de membres du domaine des *Crenarchaeota* (Konneke et al., 2005; Francis et al., 2007).

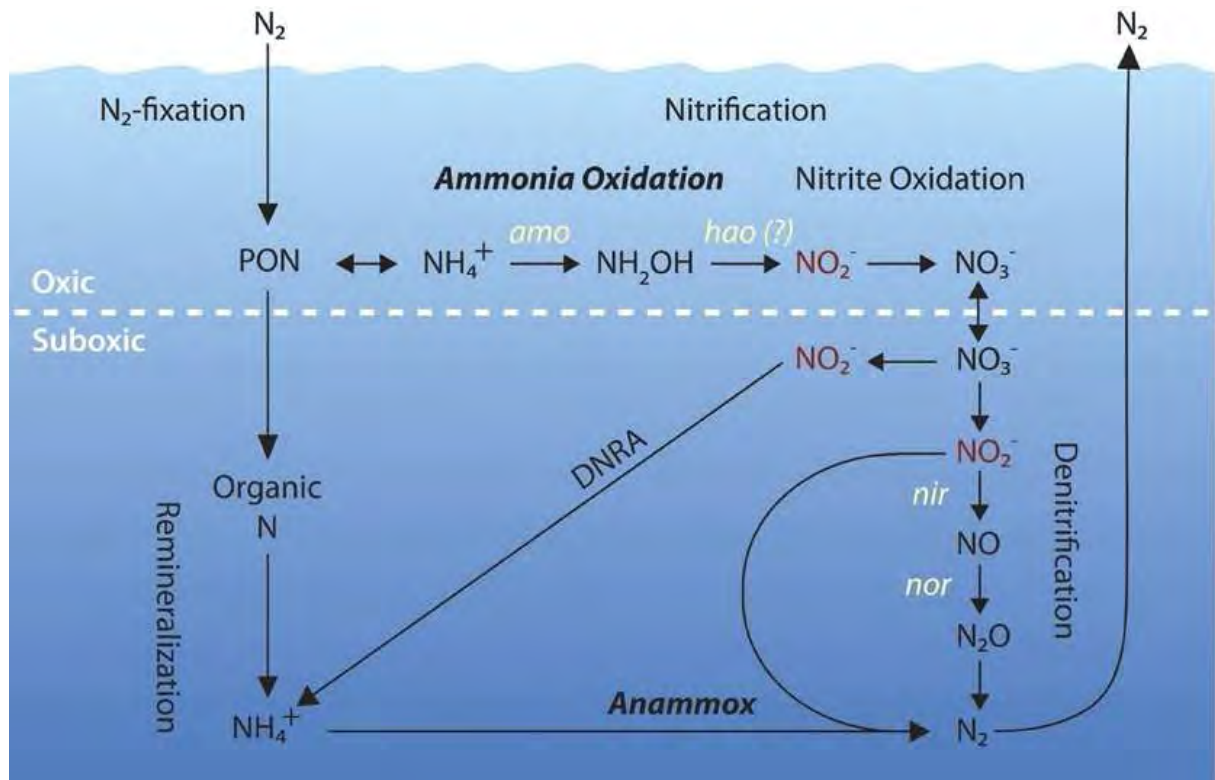


Figure 10. Transformations microbiennes de l'azote dans les environnements marins oxiques et anoxiques (Francis et al., 2007). DNRA : réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium. AMO : ammonium mono-oxygénase. HAO : hydroxylamine oxydoréductase bactérienne. *Nir* : gène nitrite réductase. *Nor* : gène de réduction de l'oxyde nitrique. PON : azote organique particulaire.

1.3.5. Le cycle du carbone

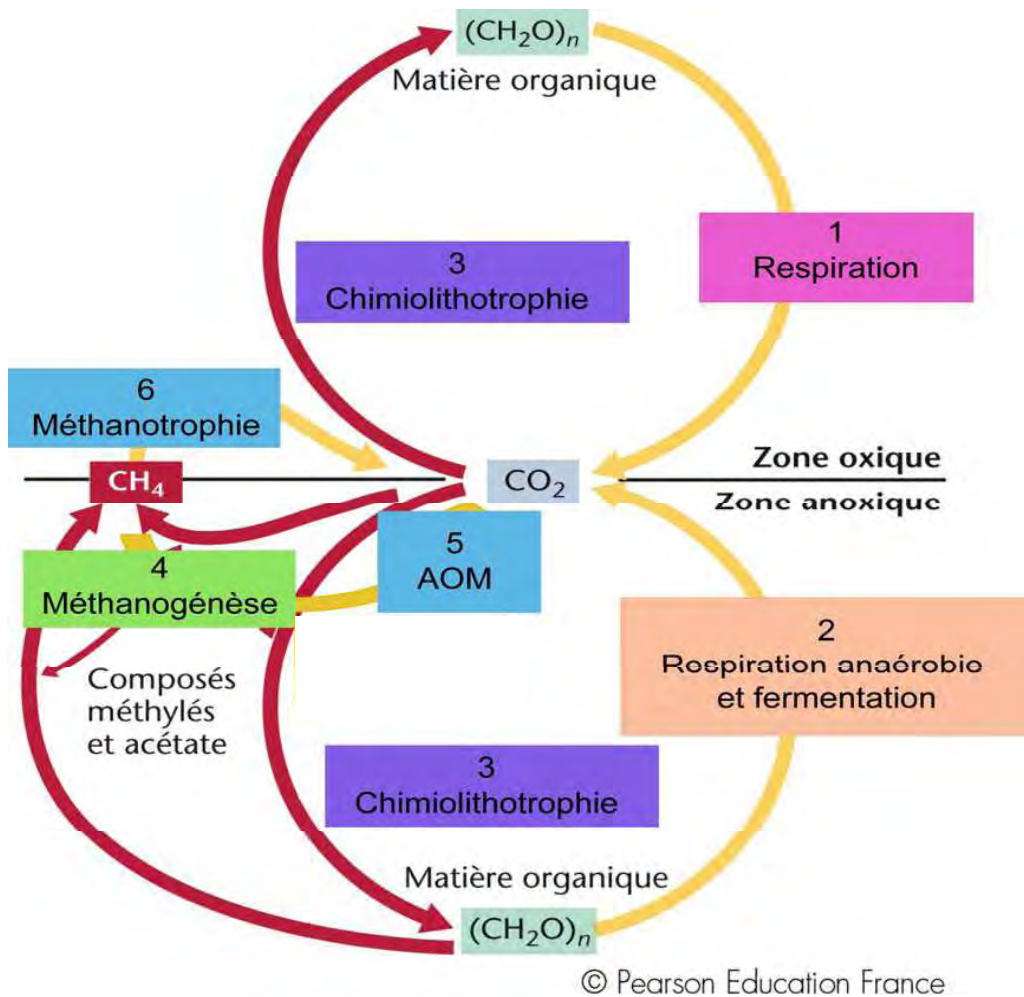


Figure 11. Principales réactions du cycle du carbone en domaine hydrothermal (Madigan et al., 2008). Modifié par Byrne (Byrne, 2008).

1.3.5.1. Utilisation du carbone organique (1 et 2, Fig. 11)

Les molécules organiques sont utilisées aussi bien dans des réactions cataboliques par des procaryotes organotrophes que dans des réactions anaboliques par des animaux ou micro-organismes hétérotrophes. Les populations organotrophes oxydent les composés organiques grâce à deux mécanismes distincts :

- la fermentation, dans laquelle la réaction d'oxydation est couplée à la réduction d'un composé dérivé du donneur d'électrons ;

- la respiration, dans laquelle l'accepteur d'électrons est exogène : il s'agit soit de l'oxygène moléculaire (respiration aérobie), soit d'un autre accepteur réduit comme le nitrate, le soufre élémentaire, etc. (respiration anaérobie).

Dans les environnements hydrothermaux, de nombreuses espèces sont impliquées dans la dégradation de la matière organique par les voies fermentaires ou respiratoires. Pour le domaine des *Bacteria* on peut citer les *Firmicutes* (*Caminicella*) (Alain et al., 2002b), les *Thermotogales* (*Marinitoga*, *Thermosipho*) (Takai and Horikoshi, 2000; Wery et al., 2001; Postec et al., 2005c), les *Thermales* (*Vulcanithermus*) (Miroshnichenko et al., 2003) et le groupe des *Bacteroidetes* (Nakagawa and Yamasato, 1993). Pour le domaine des *Archaea* sont notamment impliquées des *Thermococcales* (*Euryarchaeota*) qui comptent plus d'une vingtaine d'espèces organotrophes décrites et les *Desulfurococcales* (*Crenarchaeota*), qui comportent à la fois des espèces organotrophes et lithotrophes.

1.3.5.2. Production primaire (3 Fig. 11)

Les écosystèmes chimiosynthétiques présentent d'importantes et diverses communautés de bactéries et d'archées autotrophes capables de fixer le carbone inorganique (CO_2 , CO, CH_4). Les cycles de Calvin-Benson et des acides tricarboxyliques inversé « reverse TCA ou rTCA », une variante du cycle de Krebs, sont les principales voies d'assimilation du carbone en milieu hydrothermal. La fixation du carbone passe majoritairement par la voie de Calvin-Benson (Fig. 12) au moyen d'une ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO) présentant des similarités avec celle des organismes photosynthétiques. Cette enzyme assure également des fonctions d'oxygénase et de carboxylase, mais la réaction de fixation du CO_2 est favorisée. Deux formes de RuBisCO sont fréquemment détectées en milieu hydrothermal : la forme I est adaptée à des conditions oxiques et la forme II à des conditions plutôt anoxiques (Cavanaugh and Robinson, 1995; Haygood, 1996; Elsaied and Naganuma, 2001; Elsaied et al., 2007). Ces deux formes diffèrent par leur structure mais aussi par la signature isotopique qu'elles génèrent (Scott et al., 2004; Scott et al., 2007; Tabita et al., 2008). Le cycle inversé des acides tricarboxyliques, dont l'importance est en train d'être réévaluée, est une variante du cycle de Krebs qui est utilisée par de nombreuses *Epsilonproteobacteria* (Campbell and Cary, 2004; Campbell et al., 2006).

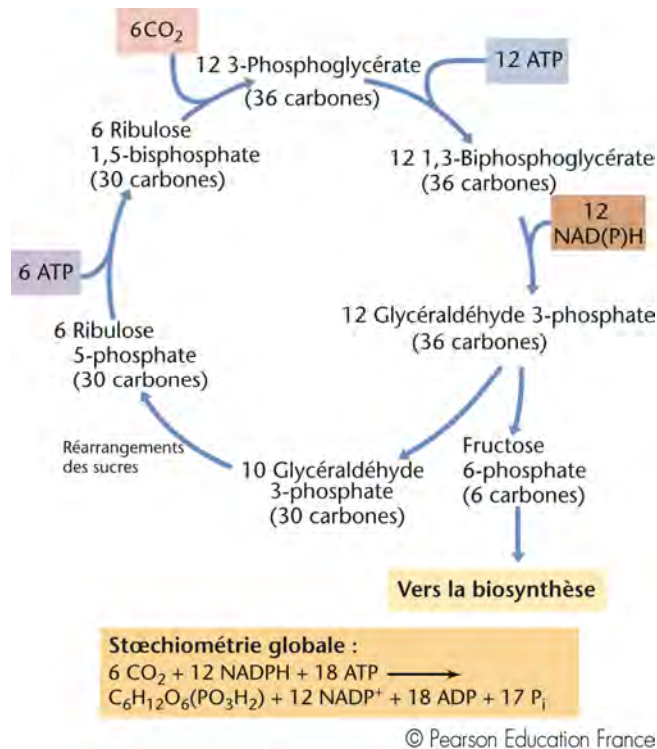


Figure 12. Cycle de Calvin (Madigan et al., 2008).

Les populations autotrophes peuvent être décrites par des approches moléculaires utilisant des amorces spécifiques des gènes codant les enzymes clés de ces deux cycles : les gènes *cbbL* et *cbbM*, codant les deux formes de la d-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (RuBisCO), ainsi que le gène *acIB*, codant l'ATP-citrate lyase sub-unit B. Les gènes *CbbL/M* sont des marqueurs usuels de l'autotrophie (De Burgh et al., 1989) et le gène *acIB*, qui code une enzyme clé du cycle rTCA, est devenu le marqueur standard pour cette voie (Takai et al., 2005; Campbell et al., 2006). Ce sont les trois gènes que nous avons choisi pour caractériser les populations autotrophes des tapis microbiens de Lucky Strike.

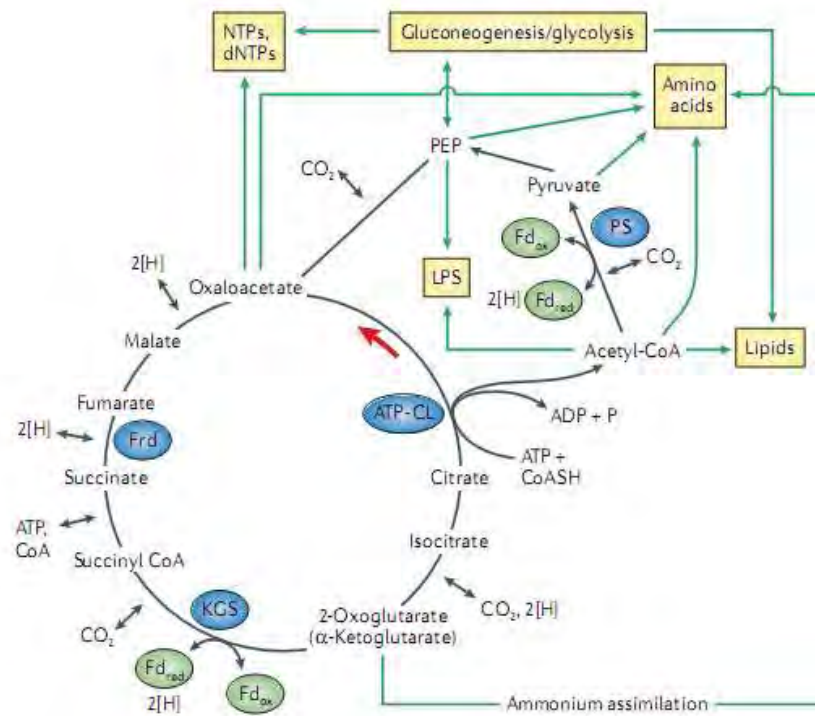


Figure 13. Cycle inversé des acides tricarboxyliques (Campbell et al., 2006)

1.3.5.3. Méthanogenèse et oxydations du méthane (4, 5 et 6, Fig. 11)

La production biogénique de méthane en milieu hydrothermal est principalement liée à l'activité d'archées thermophiles affiliées à l'ordre des *Methanococcales*, comme *Methanocaldococcus jannaschii*, *M. vulcanius* et *M. infernus* (Jones et al., 1983; Jeanthon et al., 1998; Jeanthon et al., 1999), *Methanothermococcus okinawensis* (Takai et al., 2002), *Methanoterris formicicus* (Takai et al., 2004a), ou bien à des *Methanopyrales*, comme *Methanopyrus kandleri* (Burggraf et al., 1991). Ces espèces, dites hydrogénotrophes, utilisent le couple d'oxydoréduction H_2/CO_2 (Jeanthon et al., 1998; Jeanthon et al., 1999). Des populations de méthanogènes mésophiles affiliés aux *Methanomicrobiales* et *Methanosarcinales* (Teske et al., 2002; Dhillon et al., 2005) ont également été identifiées dans le bassin de Guaymas. Ces archées utilisent le H_2 (parfois le formate, le monoxyde de carbone ou certains alcools) comme donneur d'électron et le CO_2 (parfois l'acétate ou des composés méthylés) comme accepteur et comme source de carbone.

Le méthane peut être oxydé dans la frange anaérobie des sédiments marins à travers lesquels le fluide diffuse. Cette oxydation est vraisemblablement réalisée par des consortia cellulaires contenant des bactéries sulfato-réductrices ainsi que des archées (Teske et al., 2002). Certaines de ces archées sont en effet capables d'inverser la méthanogenèse afin d'oxyder le méthane en conditions anaérobies, grâce à leur association avec des *Deltaproteobacteria* sulfato-réductrices telles que *Desulfococcus* ou *Desulfurosarcina*. Le mécanisme n'est pas parfaitement connu, mais on pense qu'il est basé sur l'appauvrissement du microenvironnement en protons, suite à leur utilisation par les sulfato-réducteurs : localement, des conditions thermodynamiquement favorables à l'oxydation du méthane seraient ainsi créées (Boetius et al., 2000a; Orphan et al., 2001). Le méthane serait oxydé en acétate, qui lui-même serait oxydé en CO₂ par les sulfato-réducteurs (Moran et al., 2008).

Le méthane d'origine biogénique ou thermogénique peut être oxydé en CO₂ par les populations méthanotrophes lorsqu'il atteint les zones oxygénées (Knittel et al., 2003; Orphan and Ussler, 2004). Parmi les méthanotrophes stricts, on rencontre des *Alphaproteobacteria* et des *Gammaproteobacteria*. Des phénomènes de symbioses entre méthanotrophes et invertébrés ont été mis en évidence dans les zones à basse température des écosystèmes hydrothermaux (Duperron et al., 2005; Duperron et al., 2006; Zbinden et al., 2008) et des espèces méthanotrophes ont été également détectées grâce à des inventaires moléculaires sur des tapis microbiens (cf. 3.1.). Aucune espèce de méthanotrophes thermophiles n'a été isolée à ce jour.

L'enzyme clé de la méthanotrophie est la méthane monooxygénase (Fig. 14) qui, en présence d'oxygène et d'hydrogène, oxyde le méthane en méthanol (Anthony, 1982). Cette enzyme peut exister sous forme particulaire liée à la membrane (Particulate membrane form of the methane monooxygenase : pMMO), ou bien sous forme soluble dans le cytoplasme (sMMO). La forme particulaire est présente chez tous les méthanotrophes, à l'exception du genre *Methylocella* (Dedysh et al., 2000), tandis que la forme soluble n'a été signalée que chez un nombre restreint de souches (Fuse et al., 1998; Shigematsu et al., 1999). Le gène *pmoA*, codant la forme particulaire de cette enzyme, constitue ainsi une voie d'étude efficace des populations méthanotrophes, d'autant plus que sa phylogénie recoupe celle du gène codant l'ARNr 16S (Duperron, 2005).

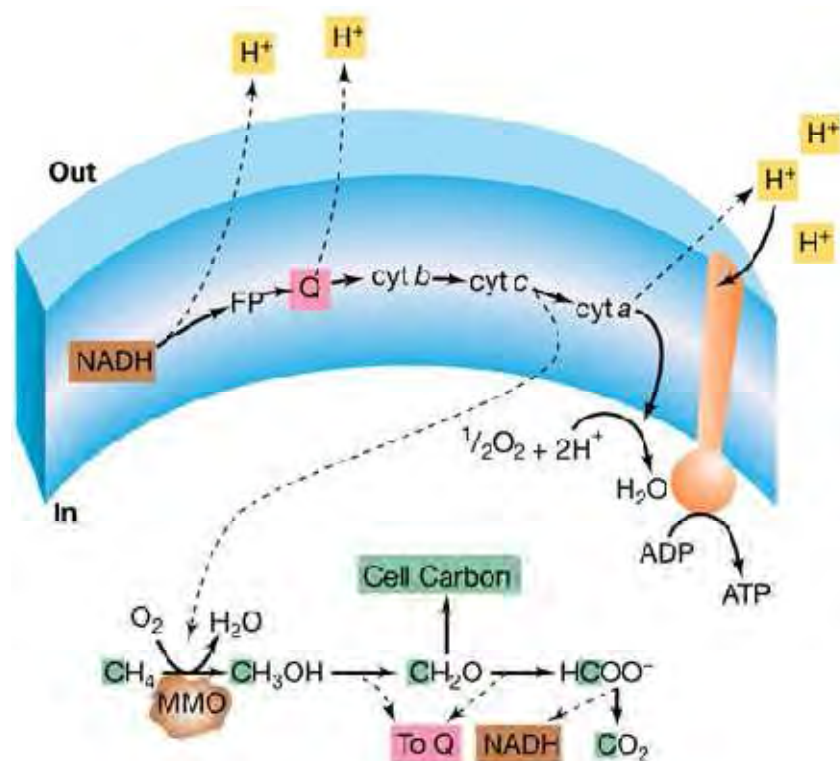
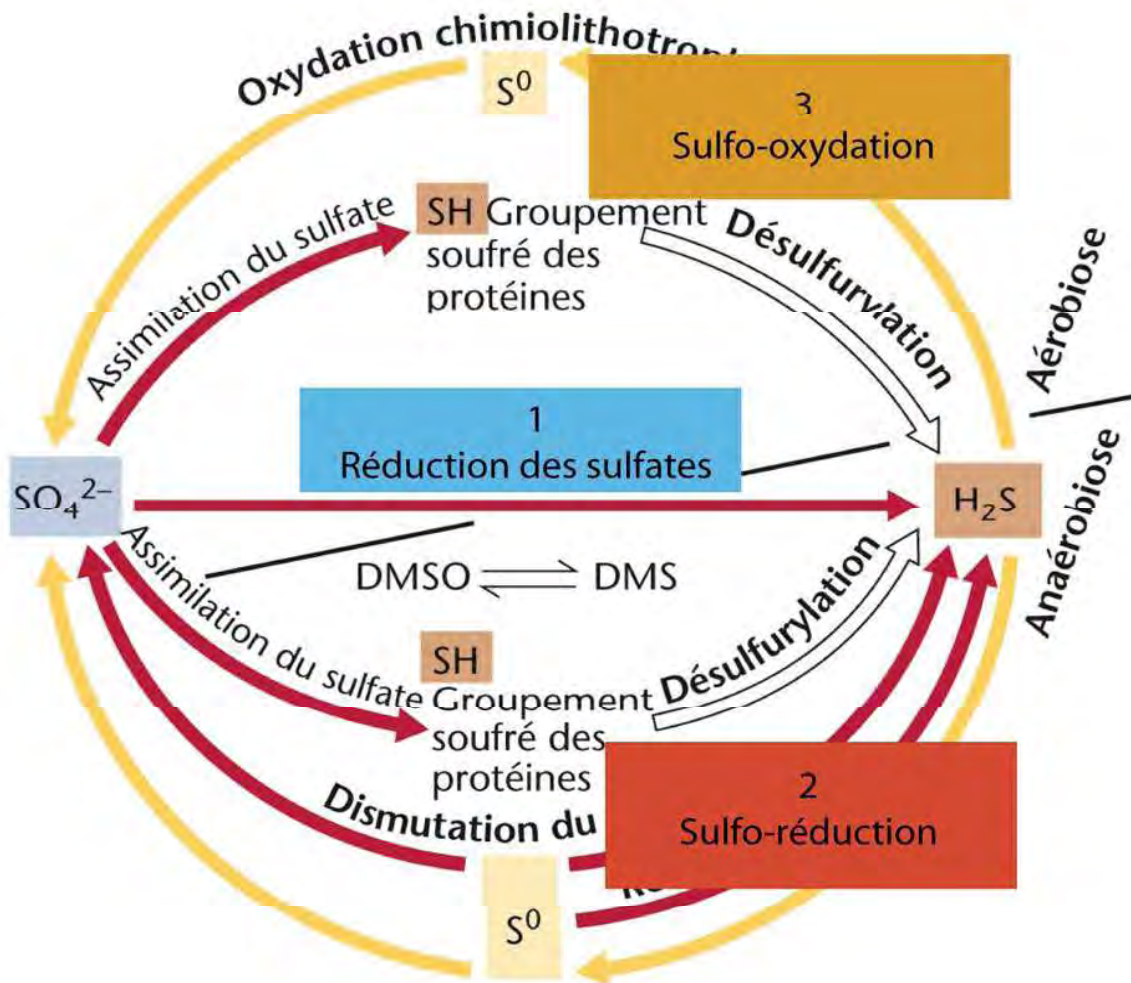


Figure 14. Oxydation aérobie du méthane par les bactéries méthanotrophes. Le méthane est converti en méthanol par la méthane mono oxygénase (MMO) à l'aide d'électrons issus du cytochrome c. Les électrons obtenus au cours des étapes suivantes alimentent la chaîne de transport qui maintient la force proton-motrice. L'essentiel du carbone utilisé pour la biosynthèse provient du formaldéhyde (CH_2O). Q : quinone, cyt : cytochrome (Madigan et al., 2008)

1.3.6. Le cycle du soufre

La plus grande partie du soufre sur terre se trouve dans les sédiments marins sous forme de minéraux sulfatés (gypse, CaSO_4) et sulfurés (pyrite, FeS_2). En contexte hydrothermal, les composés soufrés sont apportés par le fluide après lessivage de ces minéraux ; les précipités de sulfures métalliques formés au contact de l'eau de mer sont à l'origine des cheminées hydrothermales (Sassen et al., 2004).



© Pearson Education France

Figure 15. Principales réactions du cycle du Soufre (Madigan et al., 2008) modifié par Byrne (Byrne, 2008).

1.3.6.1. La réduction des sulfates (1, Fig. 15)

Le sulfate (SO_4^{2-}) est la forme la plus oxydée du soufre et l'un des principaux anions présents dans l'eau de mer (environ 8% des ions totaux). Il est utilisé comme accepteur terminal d'électrons par les micro-organismes sulfato-réducteurs. Différents donneurs d'électrons sont utilisés par ces organismes, les principaux sont l'hydrogène, le pyruvate et le lactate (Rabus et al., 2006). Le produit final de la réduction est l' H_2S , qui est rejeté tel quel ou bien immédiatement assimilé par la cellule au sein d'acides aminés (Rabus et al., 2006). Les

sulfates forment ainsi la voie d'entrée du soufre dans le métabolisme cellulaire (Madigan et al., 2008).

Une importante diversité morphologique et physiologique de bactéries sulfato-réductrices est connue. Ces bactéries sont très majoritairement affiliées à la classe des *Deltaproteobacteria* (genres *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfuromonas*, etc.), aux *Firmicutes*, avec principalement des espèces du genre *Desulfotomaculum* (Pikuta et al., 2000) et aux *Thermodesulfobacteria* avec des représentants des genres *Thermodesulfobacterium* et *Thermodesulfatator* (Alain et al., 2010).

Au sein des *Archaea*, des espèces thermophiles du genre *Archaeoglobus* ont été isolées des édifices hydrothermaux actifs (Burggraf et al., 1990; Mori et al., 2008). Il s'agit du seul genre connu de sulfato-réducteurs pour le domaine des *Archaea*.

1.3.6.2. La sulfo-réduction (2, Fig. 15)

En contexte hydrothermal actif, un grand nombre d'espèces aux métabolismes variés sont capables de réduire le S^0 et d'autres composés soufrés comme le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) :

- Des organotrophes anaérobies fermentaires tels les *Thermococcales* et les *Thermotogales*. La réduction du S^0 n'est pas indispensable à leur croissance mais la stimule. Les *Thermotogales* réduisent également des composés soufrés plus oxydés comme le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$).
- Des lithotrophes pour lesquelles le S^0 est l'accepteur terminal d'électrons. Dans le domaine des *Bacteria* on peut citer plusieurs genres thermophiles et hyperthermophiles : *Desulfurobacterium* (L'Haridon et al., 1998; Alain et al., 2003; L'Haridon et al., 2006), *Balnearium* (Takai et al., 2003) et *Thermovibrio* (Vetriani et al., 2004), qui forment une lignée distincte au sein des *Aquificales*. Pour le domaine des *Archaea* le genre hyperthermophiles *Ignicoccus* est le groupe le plus représentatif (Huber et al., 2000; Huber et al., 2002a).

–

1.3.6.3. La sulfo-oxydation (3, Fig. 15)

L'environnement hydrothermal est riche en composés soufrés plus ou moins réduits : S^{2-} , S^0 , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$. Les micro-organismes sulfo-oxydants utilisent ces composés comme donneur d'électrons en catalysant leur oxydation. L'accepteur d'électron est généralement l' O_2 mais le nitrate est utilisé par un certain nombre d'organismes si l' O_2 est présent à de trop faibles concentrations. Cette réaction se produit généralement dans la zone de transition oxydante/anoxique (OATZ) entre le fluide anoxique qui apporte les composés soufrés et l'eau de mer oxygénée.

Les micro-organismes sulfo-oxydants tiennent un rôle écologique majeur dans les écosystèmes hydrothermaux. Beaucoup d'entre eux sont lithotrophes : l'oxydation des composés soufrés réduits est, en contexte hydrothermal, une des réactions principales de production d'énergie nécessaire à la fixation du CO_2 . De nombreux sulfo-oxydants vivent en symbiose avec des représentants de la faune hydrothermale comme le vestimentifère *Riftia pachyptila* ou des moules de genre *Bathymodiolus*; on parle alors de symbiontes « thiotrophes ». Des bactéries filamenteuses sulfo-oxydantes, appartenant notamment à l'ordre des *Thiotrichales*, peuvent également former d'épais tapis dans les OATZ et ainsi créer des niches propices à une grande diversité de sulfo-oxydants. Dans les édifices hydrothermaux actifs deux espèces bactériennes, toutes deux thermophiles : *Persephonella marina* et *P. guaymanensis* (*Aquificales*) ont été isolées sur un site du Pacifique (Gotz et al., 2002; Nakagawa et al., 2003).

Il existe deux voies métaboliques d'oxydation des composés réduits contenant du soufre : la voie de la sulfite-oxydase et la voie de l'adénosine phosphosulfate (APS) réductase (Fig. 16). La voie de la sulfite-oxydase est souvent majoritaire, mais la voie de l'APS réductase est utilisée par divers micro-organismes dont des *Gammaproteobacteria* symbiontes de bivalves, comme *Idas* spp. et *Bathymodiolus* spp. (Duperron et al., 2005; Duperron et al., 2006; Meyer et al., 2007; Meyer and Kuever, 2007b, a; Duperron et al., 2008). Les gènes *soxB* et *aprA*, codant respectivement pour un des éléments du complexe enzymatique de la sulfite-oxydase et pour la sous unité α de l'APS réductase, sont les deux marqueurs fonctionnels de ces voies métaboliques (Meyer et al., 2007; Meyer and Kuever, 2007c). Il faut noter que l'APS réductase est utilisée aussi bien par les sulfo-oxydants que par les sulfo-réducteurs : elle catalyse la réduction de l'APS en sulfite et adénosine monophosphate dans

le premier cas et la réaction inverse dans l'autre. Il s'agit d'une enzyme à domaines multiples comprenant une sous unité α et une β encodées par, respectivement, les gènes *aprA* et *aprB*. Le gène *aprA* est celui qui a été proposé comme marqueur phylogénétique usuel pour les populations impliquées dans la sulfo-oxydation ou dans la sulfo-réduction (Hipp et al., 1997; Kelly et al., 1997; Petri et al., 2001; Blazejak et al., 2006).

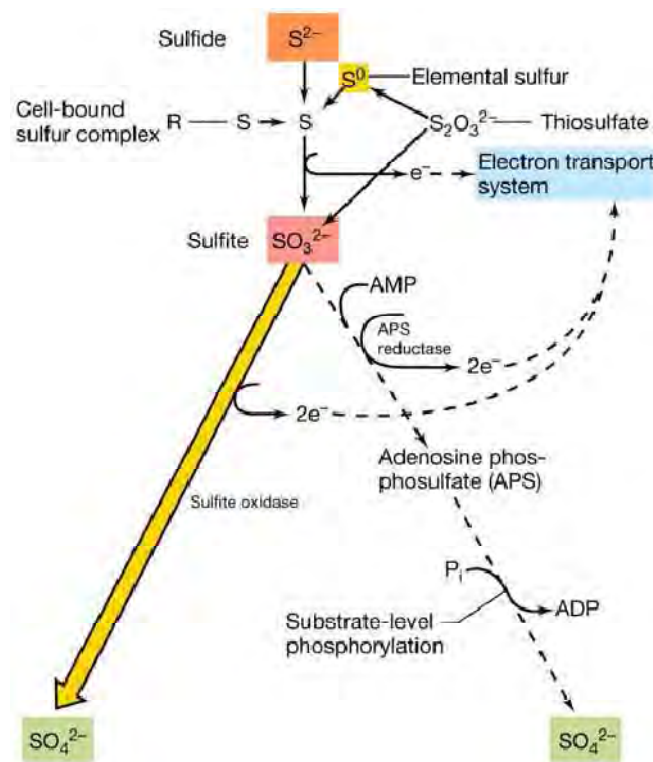


Figure 16. Oxydation des composés réduits contenant du soufre. La voie utilisant la sulfite oxydase est souvent majoritaire. (Madigan et al., 2008)

1.4. La faune des écosystèmes hydrothermaux océaniques

1.4.1. Caractéristiques

Les conditions physico-chimiques propres aux environnements hydrothermaux, ainsi que l'importance du compartiment microbien dans ces écosystèmes, permettent l'installation d'une macrofaune présentant des caractéristiques singulières (Prieur, 1998; Desbruyères et al., 2000) :

- une biomasse très importante répartie sur des aires limitées : jusqu'à 50 kg par m² contre moins de 1 g par m² pour l'environnement abyssal « classique » ;
- une faible diversité spécifique en comparaison avec celles des communautés benthiques profondes ;
- un fort taux d'endémisme : 97% des espèces appartiennent à de nouveaux taxons (du genre jusqu'à l'ordre) ;
- une distribution en cercles concentriques autour des points d'émission des fluides : la vie hydrothermale se concentrant dans la zone de mélange entre les fluides hydrothermaux et l'eau de mer ;
- des stratégies de propagation : l'activité hydrothermale est instable et les sources ont une durée de vie limitée, en particulier au niveau des dorsales à fort taux d'expansion. Pour coloniser de nouveaux sites, certains organismes utilisent leur mobilité, alors que pour les organismes fixés ce sont leurs propagules (larves par exemple) qui seraient transportées par les espèces mobiles ou les courants marins ;
- un développement inféodé aux micro-organismes, en particulier les micro-organismes symbiotiques impliqués dans la production primaire chimiosynthétique et la détoxification. Ces associations symbiotiques constituent l'une des caractéristiques majeures de cette faune.

1.4.2. Le réseau trophique : importance des symbioses

La production primaire chimiosynthétique est assurée par des micro-organismes qui constituent le premier maillon de la chaîne trophique hydrothermale. Les consommateurs primaires (également producteurs secondaires) utilisent cette production primaire chimiosynthétique, notamment au sein d'associations symbiotiques. Dans ce cas, l'hôte tire généralement son énergie d'un symbiote bactérien thiotrophe et/ou méthanotrophe. Parmi les métazoaires pour lesquels ont été décrites des endosymbioses nutritives, on peut citer : le vestimentifère *Riftia pachyptila* (Distel et al., 1988), les mollusques bivalves *Bathymodiolus thermophilus* (Distel and Cavanaugh, 1994), *B. azoricus* (Duperron et al., 2005; Duperron et al., 2006) et *Calyptogena magnifica* (Distel et al., 1988), les crustacés *Rimicaris exoculata* (Zbinden et al., 2008; Durand et al., 2010) et les gastéropodes *Alviniconcha hessleri* (Endow and Ohta, 1989).

Ces consommateurs primaires et les bactéries elles-mêmes alimentent ensuite toute une faune de prédateurs : crustacés, poissons, pieuvres, etc. qui vivent autour des sources hydrothermales sans participer à la synthèse primaire de matière organique. Ces prédateurs appartiennent soit à des espèces inféodées aux sources hydrothermales, soit à des espèces abyssales attirées par la présence de grandes quantités de nourriture. Plus loin, dans des zones qui ne sont plus directement influencées par le fluide, se développe une faune d'animaux filtreurs : vers serpulidés, anémones de mer, éponges, etc. qui se développent grâce aux retombées des particules émises par la source hydrothermale.

Ce modèle est néanmoins à relativiser car dans un système ouvert et complexe tel que l'environnement hydrothermal, de nombreux paramètres influent sur les relations trophiques : des liens entre la distribution des communautés faunistiques et la diffusion du fluide, le type de substrat et les conditions physico-chimiques ont ainsi été montrés (Sarrazin et al., 1997; Sarrazin and Juniper, 1999; Sarrazin et al., 1999). De plus, la dichotomie entre producteurs primaires et producteurs secondaires apparaît difficile à établir pour les espèces hydrothermales : plusieurs espèces inféodées à ces écosystèmes pourraient être des espèces généralistes qui ne se restreindraient pas à une seule source de nourriture.

1.4.3. La faune du site de Lucky Strike

Les sites de la dorsale Médio-atlantique se partagent principalement entre ceux dominés par la crevette *Rimicaris exoculata* et ceux dominés par les moules de genre *Bathymodiolus spp.*



Figure 17. Moules *Bathymodiolus azoricus* et *Mirocaris fortunata*, édifice Tour Eiffel, site de Lucky Strike. Campagne Bathyluck (2009).

La faune de Lucky Strike est dominée par des modioles (*Bathymodiolus azoricus*) qui forment de larges moulières autour des structures hydrothermales actives, ou bien sont disposées autour de zones à travers lesquelles un fluide de température modéré diffuse (Fig. 17). Bien que soumis à des variations temporelles, l'environnement de ces moulières est caractérisé par un pH compris entre 5,9 et 7,3, ainsi que par des concentrations en sulfures et méthane permettant une activité chimiosynthétique : 0,8-20 μM ΣS total et 4-9 μM CH_4 (Sarradin et al., 1999; De Busserolles et al., 2009; Cuvelier et al., sous presse). Ces moules *Bathymodiolus azoricus* sont associées à des bactéries endosymbiontes thiotrophes, mais aussi à des

méthanotrophes (Duperron et al., 2006). Des tapis microbiens, très présents sur le site de Lucky Strike, recouvrent la plupart de ces assemblages de modioles, ainsi que certaines zones de dépôts hydrothermaux non colonisées par ces communautés, mais cependant sous l'influence du fluide (cf. 1.5.4.).

En dehors de *Bathymodiolus azoricus*, plusieurs espèces sont fréquemment rencontrées : des gastéropodes (genres *Protolira*, *Peltoispira*, *Lepetodrilus* et *Shinkallepas*), l'amphipode *Luckla striki*, des crevettes (genres *Mirocaris* et *Chorocaris*), le crabe *Segonzacia mesatlantica* et des pycnogonides (Desbruyères et al., 2001). En plus faible densité, sont aussi observés dans le périmètre du site des cyripèdes pédonculés et des petits hydroïdes carnivores comme *Candelabrum phryglum*. La chimère *Hydrolagus pallidus* a également été observée tout comme plusieurs poissons de genre *Gaidropsarus* (Saldanha and Biscoito, 1997; Biscoito et al., 2002).

1.4.4. Les mytilidés symbiotiques : cas de *B. azoricus* et de *B. puteoserpentis*

1.4.4.1. Écologie des mytilidés symbiotiques

Les moules symbiotiques peuplant les écosystèmes profonds chimiosynthétiques appartiennent à la famille des mytilidés (Bayne, 1976) et à la sous-famille *Bathymodiolinae* dont l'espèce type est *Bathymodiolus thermophilus* (Kenk and Wilson, 1985). Présents sur de nombreux sites de fluides chauds ou froids, les représentants du genre *Bathymodiolus* sont particulièrement adaptés à leur niche écologique (Sibuet and Olu, 1998). Leur dépendance à l'égard des fluides est en effet quasiment totale bien que leur système digestif reste fonctionnel (Page et al., 1991; Pile and Young, 1999). Ainsi, un ralentissement ou un arrêt des émissions de fluide occasionne une détérioration de leur état physiologique, une perte d'intégrité des tissus symbiotiques, une nette diminution de la densité des endosymbiontes dans leurs branchies (ils sont digérés) (Riou, 2009) et une diminution des rapports isotopiques du carbone dans les tissus, suggérant un recyclage du carbone endogène (Fisher, 1988; Kochevar et al., 1992; Raulfs et al., 2004). Cette spécialisation s'avère très efficace pour exploiter les niches écologiques liées aux environnements chimiosynthétiques.

Deux espèces de *Bathymodiolinae*, différenciées génétiquement et morphologiquement, se partagent les sites hydrothermaux de la ride Nord-atlantique (Craddock et al., 1995; Maas et al., 1999). *Bathymodiolus azoricus* est présente sur les sites les plus au Nord : Menez Gwen, Lucky Strike et Rainbow, tandis que *Bathymodiolus puteoserpentis* est observée sur les deux sites les plus proches de l'équateur : Snake Pit et Logatchev. Les deux espèces coexistent au niveau du site de Broken Spur (O'Mullan et al., 2001).

1.4.4.2. La double symbiose bactérienne des mytilidés

Les bactéries symbiotiques des mytilidés sont localisées à l'intérieur de cellules spécialisées (Fig. 18) de l'épithélium branchial : les bactériocytes (Fiala-Médioni et al., 1986; Cavanaugh et al., 1987). La branchie hypertrophiée conserve ses capacités de respiration et de filtration des particules (Page et al., 1991) et, bien que réduits, le tube digestif et les palpes labiaux demeurent fonctionnels (Fisher, 1990).

Deux principaux types de symbiotes chimiotrophes – un thiotrophe et un méthanotrophe, – peuvent coexister chez le même hôte, constituant ainsi un cas intéressant d'association à trois partenaires. Les espèces *B. azoricus* et *B. puteoserpentis* partagent les deux mêmes clades monophylétiques de symbiotes (Duperron et al., 2006). Ces symbiotes appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria*.

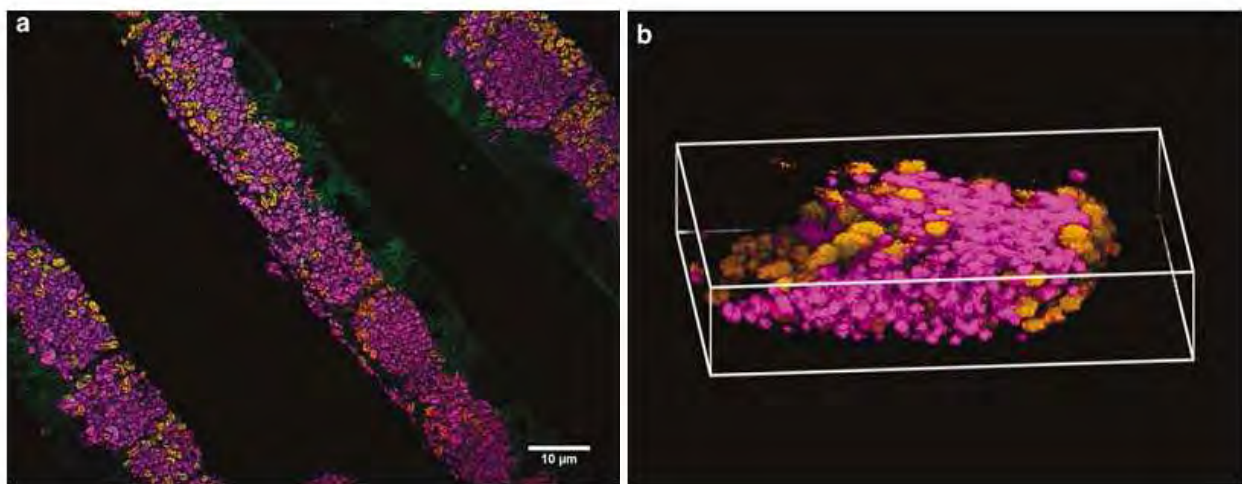


Figure 18. Hybridation Fluorescente *in situ* des endosymbiontes de *B. azoricus* sur une coupe transversale de branchie. Les thiotrophes apparaissent en rose et les méthanotrophes en orange. (a) Vue d'un filament. Échelle = 10 µm. (b) Reconstitution en 3D d'une section de 10 µm d'un bactériocyte (Halary et al., 2008).

❖ Symbiontes thiotrophes

Ces bactéries mesurent environ 0,5 μm (Fiala-Medioni et al., 1986) et utilisent une RuBisCO de forme 1 pour fixer le carbone (cycle de Calvin) en conditions aérobies (Cavanaugh and Robinson, 1995; Elsaied and Naganuma, 2001). Leur voie d'oxydation des sulfures fait intervenir une adénosine phosphosulfate réductase (APS). L'étude du gène codant l'ARNr 16S de ces symbiontes montre qu'ils forment un clade monophylétique qui inclue également les symbiontes de vésicomidés et ceux du thyasiridé *Maorithyas hadalis*. Une variation des populations de symbiontes en fonction de la nature des fluides a été démontrée (Duperron et al., 2006; Duperron et al., 2007). Les symbiontes thiotrophes dominent sur le site de Lucky Strike où le rapport $\text{CH}_4/\Sigma\text{S}$ est bas.

❖ Symbiontes méthanotrophes

Les bactéries méthanotrophes mesurent environ 1,5 μm de diamètre et possèdent une méthane mono-oxygénase (Pernthaler and Amann, 2004). Ces symbiontes méthanotrophes dominent dans les sites hydrothermaux riches en méthane comme Rainbow et Logatchev (Abrajano Jr et al., 1994; Jahnke et al., 1995; Pond et al., 1998; MacAvoy et al., 2002). Ils forment un clade monophylétique distinct mais proche des méthanotrophes libres de type 1 (Fujiwara et al., 2000).

❖ Transmission des symbiontes

Une étude basée sur le marqueur génétique ITS (Internal Transcribed Spacer) a permis de mettre en évidence un déséquilibre de liaison entre les allèles de l'hôte et ceux du symbionte thiotrophe. Cela indiquerait une transmission strictement environnementale de ces symbiontes (Won et al., 2003). L'existence d'irrégularités dans la membrane apicale des bactériocytes, évoquant des figures d'endocytose, avait déjà conduit à proposer cette hypothèse (Dubilier et al., 1998). Cependant, aucune observation directe ne permet de conclure fermement et de généraliser cette hypothèse aux autres espèces. Le mode de transmission des symbiontes méthanotrophes demeure quant à lui indéterminé.

1.5. Les tapis microbiens

1.5.1. Définition et généralités

Les biofilms sont des communautés diverses de micro-organismes adhérant entre eux ainsi qu'à une surface ou un substrat ; ils forment des structures hétérogènes et complexes que l'on observe dans de nombreux écosystèmes non statiques (Fig. 19). Ces micro-organismes génèrent une matrice constituée d'éléments polymériques de surface (EPS) qui maintient l'intégrité du biofilm.

C'est Van Leevenhock qui, au XVII^{ème} siècle, observa les premières organisations microbiennes de type biofilms à la surface de dents humaines (Donlan, 2002; Kolenbrander and Palmer Jr, 2004; Lamfon et al., 2005). Heukelekian et Heller découvrirent en 1940 que certains micro-organismes marins connaissaient un développement plus rapide et formaient une plus forte biomasse si on leur fournissait une surface sur laquelle ils pouvaient s'attacher (Heukelekian and Heller, 1940) ; phénomène également observé par Zobell en 1943 (Zobell, 1943). Il fallut cependant attendre l'arrivée du microscope électronique pour que de véritables observations de la structure des biofilms puissent être réalisées (Jones et al., 1969). Aujourd'hui, il est généralement admis que les biofilms constituent un mode de croissance privilégié des bactéries dans la nature (Costerton et al., 1995; Stoodley et al., 2002).

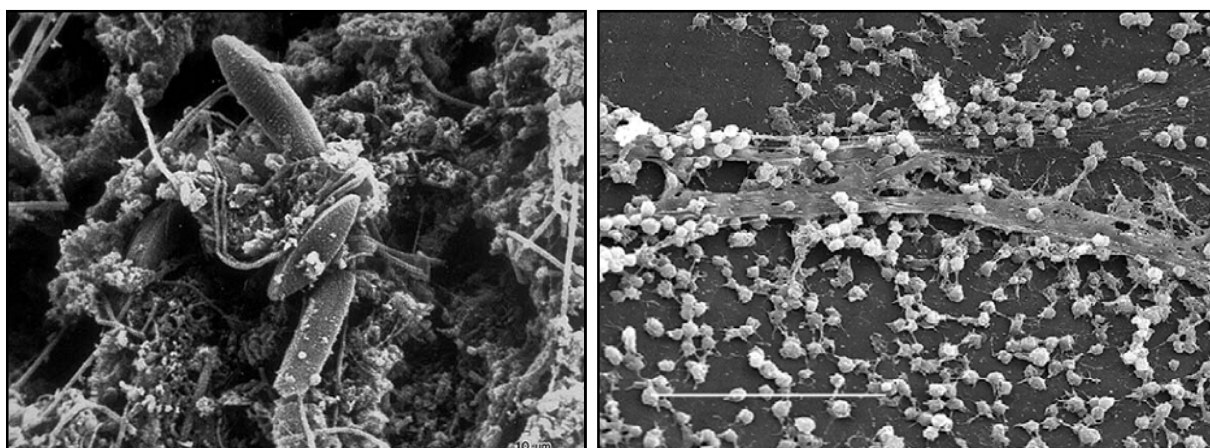


Figure 19. Vue en microscopie électronique à balayage d'un biofilm recouvrant une plaque d'acier d'un système de traitement d'eau (à gauche) et d'un biofilm de staphylocoques sur du matériel médical (à droite) (Donlan, 2002).

La notion de biofilm recouvre des communautés métaboliquement variées, composées de Cyanobactéries et d'eucaryotes phototrophes, de bactéries hétéro et autotrophes, de protozoaires, de bactéries photosynthétiques anoxygéniques, d'algues, de champignons, etc. Le terme de « tapis microbien » désignait au départ des biofilms épais présentant différentes strates aux conditions physico-chimiques variables : gradient de lumière, d'oxygène, de sulfures, etc. Le terme a ensuite été généralisé aux biofilms procaryotiques recouvrant différentes zones environnementales et ce, sans véritable considération de leur épaisseur ou organisation interne (souvent inconnue par ailleurs dans les écosystèmes chimiosynthétiques). Nous emploierons ici le terme de tapis microbiens pour désigner les biofilms relativement fins (quelques mm), composés principalement (d'après les observations) de filaments blancs attachés à diverses surfaces du site hydrothermal de Lucky Strike. Ces filaments, en perpétuelle agitation dans les courants, sont recouverts d'une matrice qui maintient une grande diversité morphologique de procaryotes autour d'eux.

Les tapis constituent des modèles d'étude intéressants pour les processus biochimiques comme les cycles élémentaires, dans lesquels un grand nombre de micro-organismes coopèrent et interagissent de façon complexe. Ils sont également souvent présents dans les écosystèmes dits extrêmes et leur étude contribue à notre compréhension de la vie extrêmophile (Seckbach and Oren, 2009).

1.5.2. Intérêts de la croissance en biofilms

Trois principaux types d'avantages caractérisent les croissances en biofilms :

- ❖ La mise en place et le maintien d'un habitat favorable

Les biofilms se développent dans des environnements souvent agités où des fluides circulent. Dans l'écosystème hydrothermal la structure en biofilms permet aux procaryotes de se maintenir dans la zone de transition oxiq/anoxiq ; ils bénéficient ainsi de la présence des composés réduits présents dans le fluide, mais aussi de l'oxygène, apporté par l'eau de mer, qui permet l'oxydation de ces composés.

Plus généralement la matrice permet de limiter les fluctuations physico-chimiques du milieu, ainsi que de retenir et concentrer des nutriments et des éléments chimiques. Des biofilms

peuvent ainsi se développer dans des environnements pauvres ou sujets à la dessiccation (Decho, 1990; Le Magrex-Debar et al., 2000). La structure de la matrice peut aussi permettre la création de gradients (O_2 , pH, T° , ions divers, etc.) dans lesquels différentes espèces microbiennes vont se positionner pour bénéficier de conditions optimales (Hall-Stoodley et al., 2004; Jefferson, 2004).

❖ Une plus grande résistance aux agents antimicrobiens

Les mécanismes de résistance sont multiples et dépendent des espèces présentes dans le biofilm et des antibiotiques ou biocides auxquelles elles sont exposées. La matrice peut se comporter comme une barrière physique (Mah and O'Toole, 2001) et dans certains cas adsorber tout ou partie des agents antimicrobiens (Hoyle et al., 1992; Suci et al., 1994). L'existence de différentes populations au sein du biofilm génère également différents niveaux de résistance de la communauté microbienne et une meilleure persistance globale. La proximité et l'organisation des espèces microbiennes permettent à ces dernières de mettre en place différents mécanismes comme l'activation du quorum-sensing, l'induction du système général de réponse au stress, l'augmentation de l'expression des pompes à efflux ou encore des modifications du profil protéique des membranes externes. Enfin, dans les environnements aquatiques, les biofilms sont une forme de protection contre les prédateurs ou protistes qui sont limités par la taille de particules qu'ils peuvent absorber (Jensen et al., 1990; Simek et al., 2001).

❖ Des transferts horizontaux de gènes facilités

La proximité des cellules favorise la propagation des bactériophages ainsi que la conjugaison et la capture de plasmides par les cellules bactériennes compétentes (Cvitkovitch et al., 2003; Molin and Tolker-Nielsen, 2003; Cvitkovitch, 2004). Les bactéries peuvent ainsi acquérir plus facilement des plasmides de résistance aux agents microbiens ou codants pour des fonctions métaboliques nouvelles (Jefferson, 2004).

1.5.3. Les tapis microbiens des écosystèmes chimiosynthétiques

On observe des tapis microbiens dans de nombreux et divers écosystèmes océaniques présentant des zones anoxiques. Certains de ces tapis sont composés quasi exclusivement par des espèces d'*Epsilonproteobacteria* (Taylor and Wirsen, 1997; Taylor et al., 1999; Moussard et al., 2006) et d'autres semblent dominés par des bactéries filamenteuses sulfuroxydantes affiliées — d'après leur morphologie — à des *Thiotrichales* : principalement aux genres *Beggiatoa* et *Thiothrix* (Jannasch and Wirsen, 1981; Jacq et al., 1989; Jannasch et al., 1989; Nelson et al., 1989; Kalanetra et al., 2004).

Ces dernières années, plusieurs études moléculaires de diversité ont été réalisées sur des biofilms provenant d'écosystèmes chimiosynthétiques tels que les zones de suintement froids (Mills et al., 2004; Heijs et al., 2005; Arakawa et al., 2006; Gilhooly et al., 2007; Omoregie et al., 2008) et les grottes sous-marines ou terrestres (Mattison et al., 1998; Engel et al., 2003; Engel et al., 2004) ; néanmoins, peu d'études ont ciblé les tapis microbiens de sites océaniques hydrothermaux (Moyer et al., 1994; Moyer et al., 1995; Longnecker and Reysenbach, 2001; Teske et al., 2002; Moussard et al., 2006; Kato et al., 2009; Gerasimchuk et al., 2010). Les principaux résultats de ces études sont présentés dans les paragraphes suivants.

1.5.3.1. Les tapis microbiens des grottes sous marines et terrestres

Des tapis microbiens ont été observés dans un certain nombre de grottes sous-marines ou terrestres présentant des sources de fluides enrichis en sulfures : les grottes Cape Palinuro (Mattison et al., 1998), Romania (Sarbu et al., 1996) et Frasassi (Vlasceanu et al., 2000) en Italie, Paxos en Grèce, Lower Kane dans le Wyoming (Engel et al., 2003) et Cesspool en Virginie (Engel et al., 2001).

Les observations réalisées à Cape Paliruno mettent en évidence deux types de tapis : des tapis marron dominés par des espèces affiliées morphologiquement à des cyanobactéries et à des méthanogènes du genre *Methanosarcina* ; des tapis blancs composés de bactéries ressemblant à des *Beggiatoa* et à des *Thiothrix*. Des *Flexibacter* sont présentes dans les deux

types de tapis et les *Beggiatoa* sont morphologiquement semblables à celles observées sur diverses surfaces du site hydrothermal de Lucky Strike (MAR) (Mattison et al., 1998).

Les inventaires moléculaires sont peu nombreux. Ceux réalisés à partir de tapis blancs provenant de Lower Kane montrent une diversité bactérienne dominée par les *Epsilonproteobacteria* (Angert et al., 1998; Engel et al., 2001; Engel et al., 2003) dans les zones présentant de fortes concentrations en sulfures et de faibles concentrations en oxygène, alors que des espèces de *Thiothrix* et *Thiobacillus* (Vlasceanu et al., 2000; Engel et al., 2001; Brigmon et al., 2003) sont plus abondantes dans les zones présentant de faibles concentrations en sulfures et de fortes concentrations en oxygène. Les analyses isotopiques du carbone indiquent une activité autotrophique importante dans ces tapis. L'étude des populations adhérant aux parois des grottes de Frassassi (Macalady et al., 2006) confirme l'importance du ratio H_2S/O_2 sur la composition des tapis : ici les *Epsilonproteobacteria* dominant quand le ratio est élevé et les *Thiothrix* quand il est bas ; les *Beggiatoa*, elles, dominant sur les interfaces eau/sédiment quelles que soient les concentrations en H_2S et en O_2 . Enfin, une étude moléculaire sur des tapis provenant d'une grotte côtière au large de Paxos (Grèce) (cf. 1.5.3.2.) a permis de construire une banque de clones dominée par les *Proteobacteria* et dans laquelle des *Thiotrichales* (*Beggiatoa* et *Thiobacterium*) sont représentées (Grunke et al., 2010).

1.5.3.2. Les tapis microbiens associés aux carcasses de baleines et bois coulés

Les tapis microbiens de ces écosystèmes sont encore peu connus : des bactéries filamenteuses ressemblant à des *Beggiatoa* spp. ont été observées sur les os des baleines et les bois coulés de différents sites. De fortes populations de champignons ayant une activité cellulolytique ont également été observées (Smith and Baco, 2003; Palacios et al., 2006). Récemment, une étude moléculaire portant sur des tapis de trois écosystèmes différents : une grotte côtière au large de Paxos (Grèce), une carcasse de baleine tombée dans un fjord suédois et une zone d'émission de fluides froids (Storegga, Norvège), a permis de construire des banques de clones présentant les mêmes caractéristiques : séquences majoritairement affiliées aux *Gamma*, *Delta* et *Epsilonproteobacteria*, mais aussi plus rarement à des

Alphaproteobacteria, des *Flavobacter*, des *Sphingobacteria*, *Planctomycetes* et *Clostridia*. Différents type de *Beggiatoa* sont représentés dans ces banques de clones, ainsi que des *Thiobacterium* (Grunke et al., 2010).

1.5.3.3. Les tapis microbiens des zones d'émission de fluides froids

Des tapis denses et épais, orange ou blancs, sont souvent présents au-dessus des zones d'émission d'hydrocarbures et dans les habitats exposés aux fluides froids riches en H₂S (Fig. 20) (Michaelis et al., 2002; Sahling et al., 2002; Mills et al., 2004; Heijs et al., 2005). Les organismes visuellement dominants appartiennent au genre *Beggiatoa* et sont capables de se mouvoir par glissement et de s'enfouir dans les sédiments lorsque les conditions environnementales sont moins favorables. Les tapis orange sont souvent associés à des zones riches en hydrocarbures, ce qui suggère que la pigmentation des *Beggiatoa* spp., ou l'absence de celle-ci, est liée à leur source principale de carbone (cf. 1.5.5.) (Larkin and Henk, 1996; Hovland et al., 2002; Hovland et al., 2005).

Les tapis blancs sont parfois recouverts, comme sur le volcan de boue Chefren (Omorigie et al., 2008), de fins enchevêtrements de filaments de sulfures identiques à ceux observés sur différents sites hydrothermaux (Taylor and Wirsén, 1997; Taylor et al., 1999). Des *Epsilonproteobacteria* du genre *Arcobacter* sont probablement impliquées dans la formation des ces structures (Omorigie et al., 2008). Des larves de polychètes ont été observées dans les deux types de tapis (Omorigie et al., 2008).



Figure 20. Tapis microbiens blancs provenant du Golfe du Mexique (à gauche). Levin, Scripps Institute of Oceanography[®]. Carottage de sédiment recouvert de tapis microbiens orange associés au volcan de boue Napoli, en Mer Méditerranée (à droite). Ifremer[®] MEDECO 2007.

Des inventaires moléculaires ont été réalisés sur un certain nombre de tapis et les premiers centimètres de sédiments provenant de différentes zones d'émissions de fluides froids : le Golfe du Mexique (Mills et al., 2004), un site au Nord-est de la mer du Japon (Arakawa et al., 2006), les volcans de boues Milano (Heijs et al., 2005) et Chefren (Omorigie et al., 2008) dans l'est de la Méditerranée. Une étude sur la chimie et les marqueurs lipidiques bactériens a également été réalisée dans le bassin d'Eel River, au large de la Californie (Orphan and Ussler, 2004).

Le domaine des *Archaea* est souvent peu représenté. Dans de nombreux tapis présentant des zones anoxiques, la diversité archéenne est réduite au groupe ANME-2 qui comprend l'ordre des *Methanosarcinales* (Mills et al., 2004; Orphan and Ussler, 2004; Heijs et al., 2005; Arakawa et al., 2006). D'autres tapis, probablement plus exposés à l'oxygène, possèdent une population archéenne comprenant principalement des *Thaumarchaeota* marines du groupe 1 (Arakawa et al., 2006). Dans les deux cas, la diversité archéenne est faible, se limitant à quelques phylotypes.

La diversité bactérienne de ces tapis (blancs ou orange) est considérablement plus élevée (Mills et al., 2004; Heijs et al., 2005). Les *Proteobacteria* sont très représentées dans les banques de clones. La classe des *Deltaproteobacteria* domine largement les couches profondes des tapis, moins exposées à l'oxygène, tandis que les couches superficielles

comptent en majorité des *Gamma* et *Epsilonproteobacteria* (Mills et al., 2004; Orphan and Ussler, 2004). Un grand nombre de phylotypes parmi les *Proteobacteria* détectées (*Alpha*, *Gamma*, *Delta* et *Epsilon*) sont liés aux métabolismes du soufre et/ou du méthane, suggérant une lithotrophie basée sur ces éléments (Heijs et al., 2005). Certains tapis microbiens présentent une forte proportion de cellules affiliées, d'après des observations par fluorescence *in situ*, à l'*Epsilonproteobacteria* sulfo-oxydante *Candidatus Arcobacter sulfidicus*, ce qui explique l'abondance de filaments de soufre recouvrant certains tapis blancs (Omoregie et al., 2008). Le phylum ubiquiste des *Bacteroidetes* est également bien représenté dans ces inventaires moléculaires. Ce groupe comprend des organismes aux métabolismes variés et versatiles, capables de dégrader de nombreuses molécules organiques, mais aussi d'oxyder des composés soufrés, sans toutefois dépendre de cette réaction pour se développer (Teske et al., 2000; Kirchman, 2002; Edwards et al., 2003).



Figure 21. Échantillonnage d'un tapis microbien du volcan de boues Milano (Est de la Méditerranée) avec une seringue en titane. L'insert montre ce même tapis grossit 400 fois par microscopie photonique (échelle : 5 μm) (Heijs et al., 2005).

1.5.3.4. Les tapis des écosystèmes hydrothermaux

Seuls quelques inventaires moléculaires de diversité ont été réalisés sur des tapis microbiens d'environnements hydrothermaux :

❖ Loihi Seamount, Hawaii

La diversité des tapis microbiens prélevés sur la structure hydrothermale active Pele, du site de Loihi Seamount a été analysée par des approches moléculaires (RFLP) (Moyer et al., 1994; Moyer et al., 1995; Moyer et al., 1998). La diversité bactérienne est élevée, même si la majorité des séquences du gène codant l'ARNr 16S dans les banques de clones est affiliée à *Thiovulum sp.* qui appartient aux *Epsilonproteobacteria* (60,5%) et à *Xanthomonas sp.* qui fait partie des *Gammaproteobacteria* (27,1%). Un OTU (operational taxonomic unit) pouvant appartenir au genre *Thiotrix* a également été identifié. L'analyse des séquences archéennes a permis la découverte de nouveaux taxons au sein des *Thaumarchaeota* marines du groupe 1 et des *Euryarchaeota* marines du groupe 2. Récemment, des études ont été réalisées sur des tapis s'étant développés dans des chambres de colonisation déposées sur ce site hydrothermal (Rassa et al., 2009). Cette approche a mis en évidence la dominance de l'espèce *Mariprofundus ferrooxydans*, un lithoautotrophe oxydant le fer et appartenant aux *Zetaproteobacteria*, dans les chambres placées à des températures inférieures à 40°C. Des OTUs affiliés à *Sulfurimonas sp.* et *Sulfovulum sp.* (*Epsilonproteobacteria*), ainsi qu'à *Thiomicrospira* (*Gammaproteobacteria*) et *Roseobacter sp.* (*Alphaproteobacteria*) ont également été identifiés.

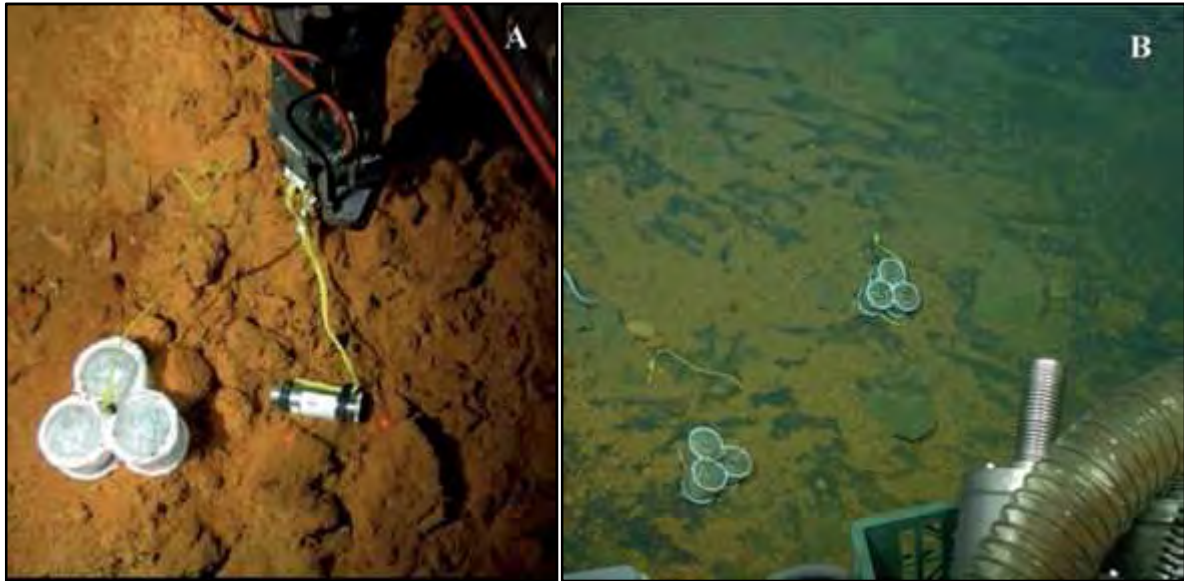


Figure 22. Photographies des colonisateurs déposés (Rassa et al., 2009).

❖ Ride Est-Pacifique (EPR), site hydrothermal à 17°S

L'inventaire moléculaire d'un tapis microbien prélevé sur une cheminée éteinte, proche d'un fumeur noir actif, a permis d'obtenir un certain nombre de séquences bactériennes du gène codant l'ARNr 16S dont la grande majorité est affiliée à des *Epsilonproteobacteria* (98%) et à quelques *Gammaproteobacteria* (Longnecker and Reysenbach, 2001). Les filaments majoritaires sont blancs (probablement à cause de la présence de cristaux de soufre) et les sondes oligonucléotidiques spécifiques des *Epsilonproteobacteria* s'y hybrident (Fig. 22).

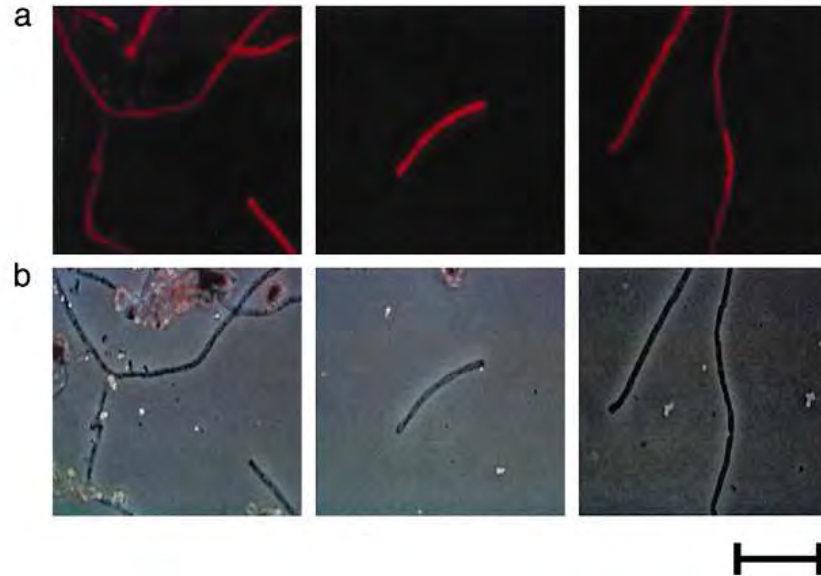


Figure 23. Hybridation fluorescente *in situ* des tapis microbiens du site 17°S de l'EPR avec une sonde *Epsilonproteobacteria* marquée en Cy3 (a). Mêmes images par microscopie photonique (b). Échelle : 20 μm (Longnecker and Reysenbach, 2001).

❖ Bassin de Guaymas

Une analyse phylogénétique des séquences bactériennes du gène codant l'ARNr 16S, couplée à une analyse isotopique des lipides, a été réalisée sur les populations microbiennes des sédiments actifs (recouverts de tapis microbiens) du bassin de Guaymas (Teske et al., 2002). Les banques de clones bactériens étaient dominées par des séquences d'*Epsilonproteobacteria*, de *Gammaproteobacteria*, de bactéries vertes non-sulfureuses et de la division candidate OP11. Les banques de séquences archéennes étaient dominées par les groupes incultivés ANME-1 et ANME-2, impliqués dans les réactions d'oxydation du méthane (Boetius et al., 2000b; Orphan et al., 2001). Les valeurs mesurées des ratios isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ des lipides correspondaient à celles d'archées impliquées dans les processus d'oxydation anaérobie du méthane, soulignant l'importance de ces processus à Guaymas.

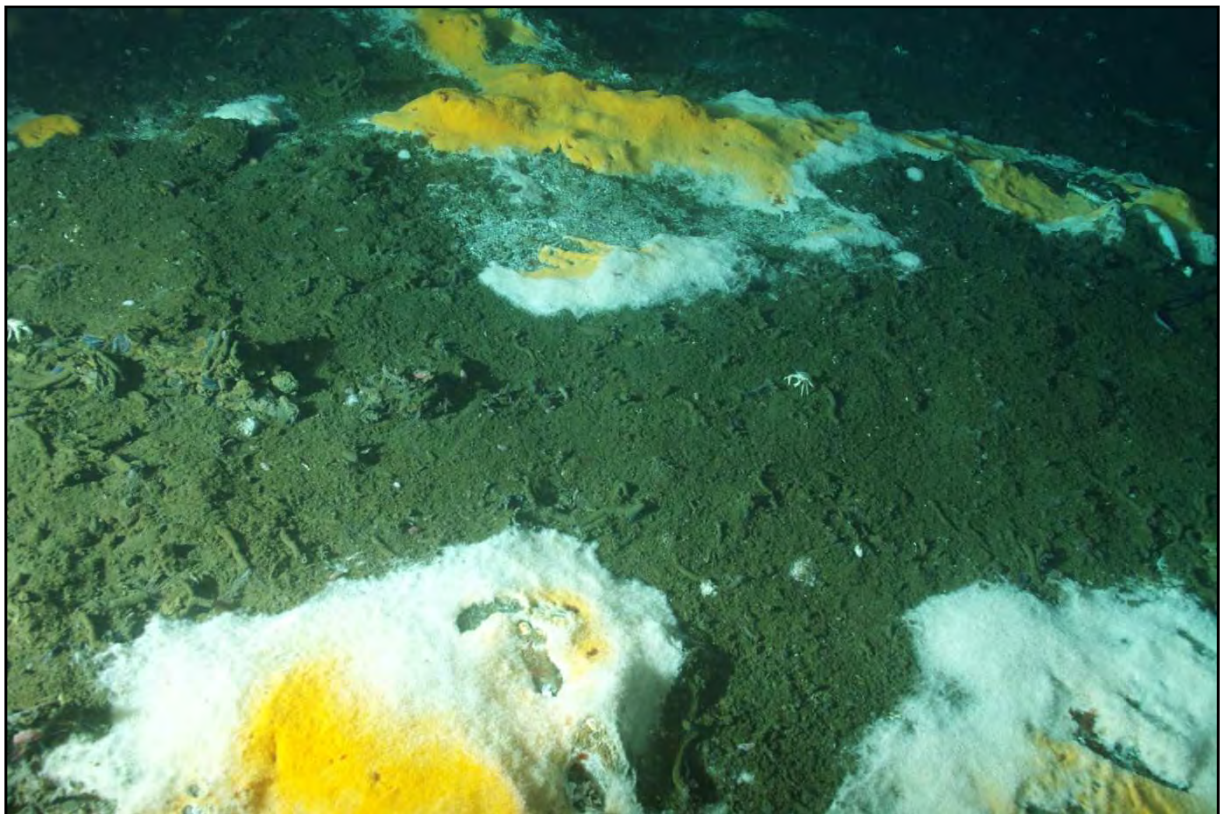


Figure 24. Tapis microbiens blancs et orange. Bassin de Guaymas. IFREMER ©, campagne Big, 2010.

❖ Site hydrothermal de Lost city (MAR)

Une étude de diversité basée sur le gène codant l'ARNr 16S et sur le gène *dsrAB*, impliqué dans la sulfato-réduction, a été réalisée sur des fragments de cheminées recouverts de tapis microbien et provenant du site hydrothermal de Lost City (Gerasimchuk et al., 2010). Aucune séquence affiliée au *Deltaproteobacteria* (le principal groupe bactérien impliqué dans la sulfato-réduction) n'a été trouvée, mais une diversité bactérienne a été mise en évidence. Les banques de clones étaient dominées par une séquence affiliée à *Thiomicrospira crunogena* (*Thiotrichales*), mais des séquences affiliées à d'autres *Gammaproteobacteria* ainsi qu'à des *Epsilonproteobacteria*, à des *Firmicutes*, à un clone de la division candidate OD1 et à une *Alphaproteobacteria* ont aussi été détectées.

D'autres types de micro-organismes, essentiellement des coques irrégulières, forment de fins biofilms (1-3 µm d'épaisseur) sur les structures poreuses de carbonate exposées aux fluides de Lost City. Ils semblent composés d'une seule espèce d'archée, affiliée aux *Methanosarcinales* (Schrenk et al., 2004; Brazelton et al., 2010).

❖ Aires hydrothermales de Fryer et Kaiko (Sud de la fosse des Mariannes)

La diversité des populations actives de deux tapis venant de sites hydrothermaux au Sud de la fosse des Mariannes (Fig. 23) ont été appréhendées par des études de biologie moléculaires et complétées par des analyses minéralogiques (Kato et al., 2009). Une grande diversité bactérienne (mais pas archéenne) a été mise en évidence, avec des OTUs affiliés à de nombreux groupes reconnus : *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* (de *Alpha* à *Zeta*), *Spirochaetes*, mais également à des groupes incultivés comme OP1, OP11, OP3, WS3 et SAR406. Les PCR quantitatives réalisées ont montré la dominance des bactéries sur les archées, ainsi que la relative abondance de *Zetaproteobacteria* (6 et 22 % des cellules, selon les tapis). Les caractérisations des diversités fonctionnelles ont mis en évidence des populations connues pour oxyder le méthane, l'ammonium et pour réduire les sulfates.

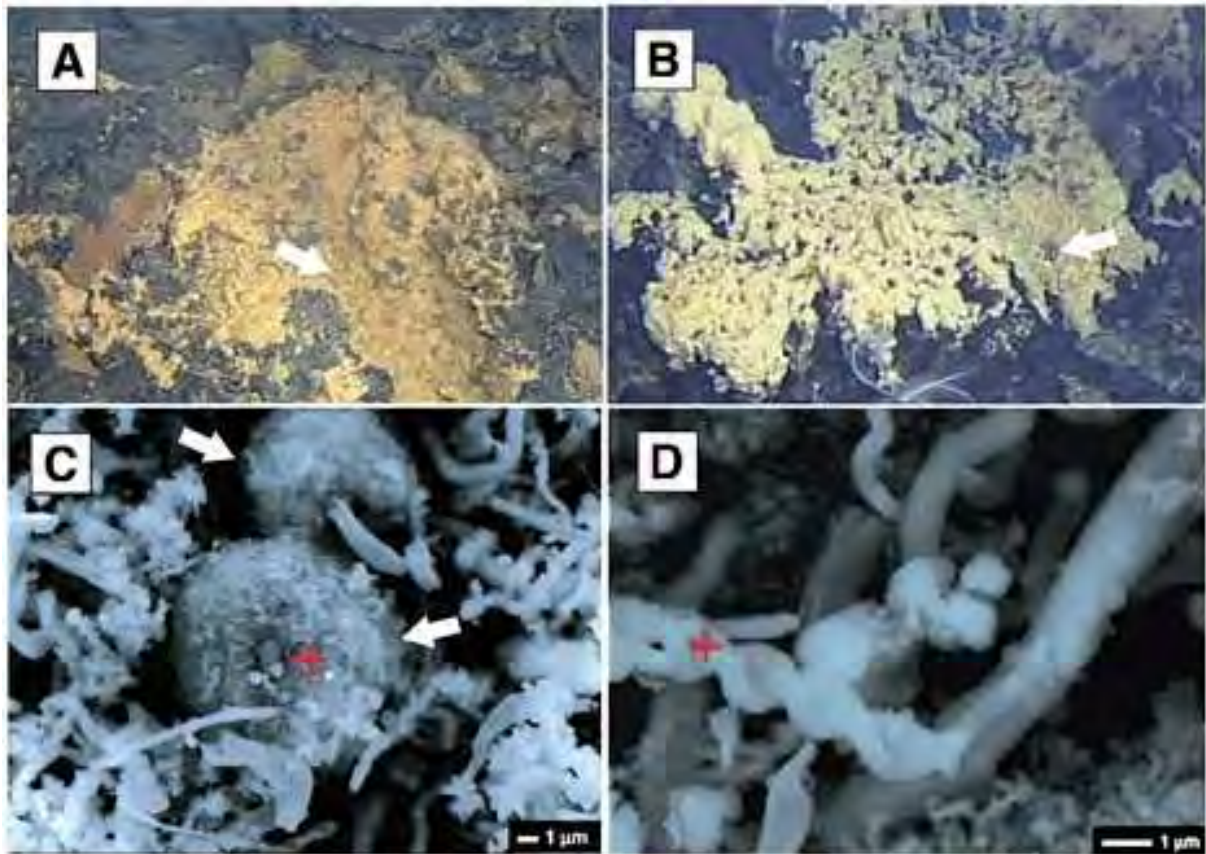


Figure 25. Observations *in situ* et par microscopie électronique à balayage des tapis microbiens du site de Kaiko (A) et Fryer (B, C et D). A et B : échelle d'environ 0,9 m, les flèches indiquent les points d'émissions du fluide. C et D : échelle de 1 μm , les flèches mettent en évidence des oxydes de manganèse (Kato et al., 2009).

Malgré ce nombre restreint d'études, la présence de tapis microbiens a été signalée dans de nombreux sites hydrothermaux. La présence de tapis composés de *Beggiatoa* spp. a notamment été rapportée au niveau de sédiments sur les zones hydrothermales côtières au large de Kodakara-Jima (Japon) et de Kolbeinsey (Island) (Hoaki et al., 1995), du rift des Galapagos (Jannasch and Wirsén, 1981), de la dorsale Est-Pacifique (Gaill et al., 1987), de systèmes côtiers (Fricke et al., 1989) et du site hydrothermal de Lucky Strike. Des *Beggiatoa* spp. associées à des *Thiothrix* spp. ont été observées dans la baie de Plenty (Nouvelle Zélande) (Sorokin, 1991) et sur le site hydrothermal côtier de White Point (Fig. 23) (Jacq et al., 1989; Kalanetra et al., 2004). La présence de *Thiothrix* spp. a également été rapportée sur des sites hydrothermaux dans l'anse de Kraternaya (iles Kurile) (Tarasov et al., 1990). Sur certains sites hydrothermaux du Pacifique (9°, 13°, bassin de Guaymas) il existe des tapis d'un autre type, composés majoritairement de l'espèce *Candidatus Arcobacter sulfidicus* (Longnecker and Reysenbach, 2001; Moussard et al., 2006). Cette bactérie sulfo-oxydante,

en synthétisant de fins filaments de soufre, forme des réseaux propices à la colonisation des surfaces hydrothermales par différentes espèces animales (Taylor and Wirsen, 1997; Taylor et al., 1999; Wirsen et al., 2002).

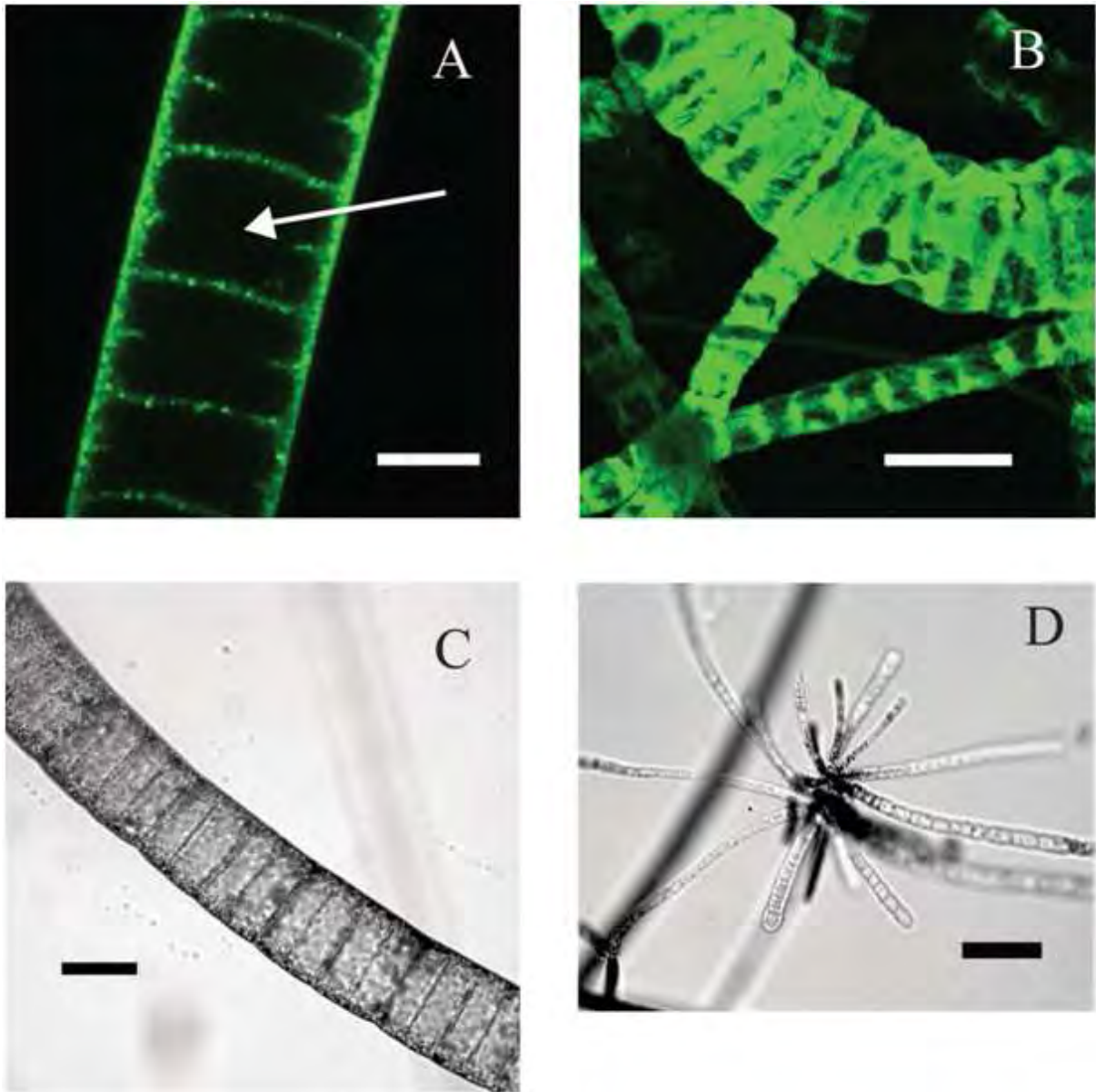


Figure 26. (A) Filament de White Point coloré en FITC et présentant de large vacuoles. Échelle : 20 μm . (B) Filaments de White Point hybridés en FISH avec la sonde WPF464, qui leur est spécifique. Échelle : 50 μm . (C) Observation en microscopie d'un grand filament de White Point. Échelle, 50 μm . (D) Observation en microscopie de filaments formant une rosette. Bar, 40 μm (Kalanetra et al., 2004).

1.5.4. Place des tapis microbiens sur le site de Lucky Strike

Les tapis microbiens, très présents sur le site de Lucky Strike, recouvrent différents assemblages faunistiques exposés au fluide hydrothermal (Fig. 27) (Cuvelier et al., 2009). Toutes les modioles ne sont pas recouvertes de tapis microbiens, qui semblent exiger un environnement particulier pour se développer : quelques centimètres suffisent pour passer d'une zone colonisée à une zone sans aucune trace visible de tapis microbiens.

1.5.5. Les bactéries filamenteuses de l'ordre des *Thiotrichales*

Les bactéries filamenteuses sont présentes dans des écosystèmes riches en soufre, où elles sont localisées aux interfaces oxiques/anoxiques, ce qui leur permet d'utiliser l'oxygène pour oxyder les composés soufrés apportés par les fluides hydrothermaux. Les genres *Beggiatoa* et *Thiothrix* sont bien adaptés à ces milieux dynamiques grâce à leur mobilité, aux réserves intracellulaires de soufre qu'ils peuvent constituer et à leur faculté de former des biofilms. Les représentants bactériens du genre *Beggiatoa* pourraient également former des structures (voiles) qui orienteraient les flux de fluides dans le sédiment afin d'optimiser leur activité métabolique (Orcutt et al., 2005).

Ces deux genres bactériens, caractérisés notamment par leur grande taille, peuvent se différencier par un critère morphologique : alors que les filaments de *Thiothrix* s'agencent en faisceaux regroupés dans une enveloppe commune, les *Beggiatoa* restent en filaments bien individualisés (Nelson et al., 1986; Teske and Nelson, 2006). On notera aussi la place du genre *Beggiatoa* dans l'histoire de la microbiologie, puisque Winogradsky s'est appuyé sur ces micro-organismes pour développer le concept de lithoautotrophie (Winogradsky, 1887; Gilhooly et al., 2007).

Plus récemment, une étude a montré la présence de *Thiotrichales* du genre *Thiobacterium* dans différents tapis provenant d'écosystèmes chimiosynthétiques (Grunke et al., 2010). Ce genre peu connu n'a pour l'instant aucun représentant cultivé. Les espèces observées ont une forme en bâtonnet et sont groupées au sein d'amas gélatineux.

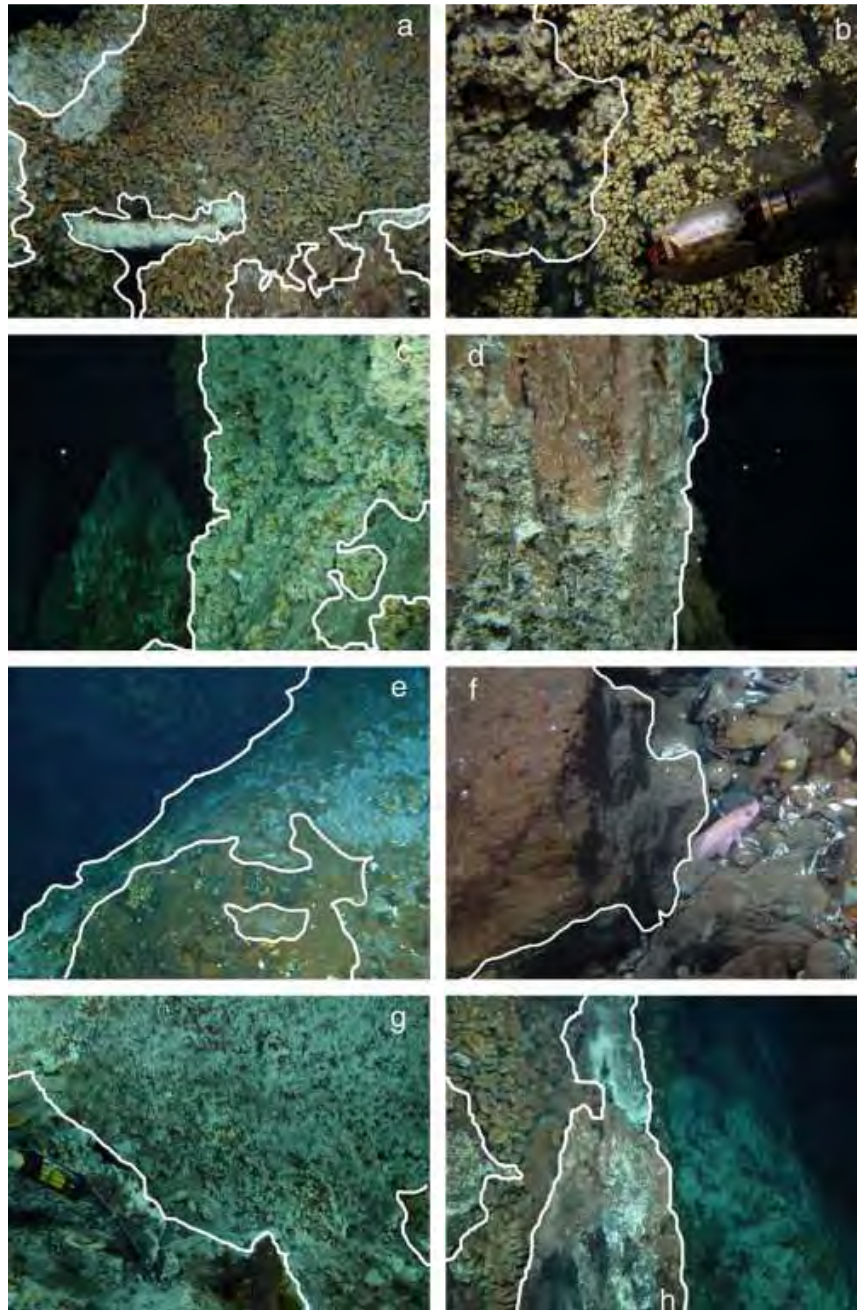


Figure 27. Assemblages faunistiques identifiés sur l'édifice de Tour Eiffel (Cuvelier et al., 2009) :

(a) Assemblage 1 : Moulière dense d'individus de grande taille (> 4 cm). Zones occasionnellement recouvertes de tapis microbiens.

(b) Assemblage 2a : Bouquets de moules (< 4 cm) plus ou moins espacés. Pas de tapis microbiens

(c) Assemblage 2b : *i.e.* mais avec des tapis.

(d) Assemblage 3 : Surfaces nues colonisées par des *Alvinocarididae*

(e) Assemblage 4a ou 4b : Surfaces présentant quelques "veines" de moules de très petite taille et recouvertes ou non de tapis (a ou b).

(f) Substratum 1a : dépôts hydrothermaux marrons/rouge.

(g) Substratum 1b : dépôts hydrothermaux recouverts de tapis microbiens.

(h) Substratum 2 dépôts hydrothermaux présentant des précipités minéraux et parfois des tapis microbiens.

Les tapis microbiens composés de *Thiotrichales* peuvent être de différentes couleurs : blanche, jaune, orange et rouge (Larkin et al., 1994; Larkin and Henk, 1996; Hovland, 2002; Nikolaus et al., 2003) ; les tapis blancs et les tapis orange sont les plus fréquents. C'est l'accumulation de réserves de soufre élémentaire par les espèces filamenteuses lithotrophes qui est la cause de la couleur blanche de certains tapis (Nelson and Castenholz, 1981; Fenchel and Bernard, 1995; Gilhooly et al., 2007). Les couleurs autres que blanche sont dues à une production de pigments.

La couleur de ces tapis pourrait avoir un lien avec la voie d'assimilation principale du carbone (autotrophe ou hétérotrophe) des organismes les composant (Nikolaus et al., 2003). Les tapis blancs et orange sont tous deux constitués principalement de *Beggiatoa* spp., mais d'espèces et de métabolismes différents. Si tous les isolats marins de *Beggiatoa* ont démontré des capacités à croître en autotrophie (Nelson and Jannasch, 1983; Nelson et al., 1986), certaines espèces marines ne sont que des autotrophes facultatifs (Hagen and Nelson, 1996). L'incubation de deux tapis de couleurs différentes, échantillonnés dans le Golfe du Mexique, a montré que le tapis blanc fixait 100 fois plus de CO₂ que le pigmenté et que dans ce dernier il n'y avait pas d'activité de la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) (Nikolaus et al., 2003). Des caractérisations chimiques et isotopiques de ces tapis ont confirmé ces résultats (Gilhooly et al., 2007). La capacité de ces micro-organismes à fixer le carbone organique ou inorganique permet une bonne adaptation aux diverses sources de carbone, notamment dans les zones d'émission de fluides froids.

1.5.6. Cultiver les *Thiotrichales*

Le genre *Beggiatoa* regroupe des espèces bactériennes peu étudiées quant à leur taxonomie, leur métabolisme et leurs relations évolutives. Les représentants du genre peuvent être trouvés en milieux dulcicoles et dans les écosystèmes marins. Le manque d'éléments sur leur métabolisme et leur enzymologie pour l'oxydation des composés soufrés s'explique par la difficulté à obtenir des cultures pures et à maintenir leur croissance en lithoautotrophie.

La capacité d'utilisation de composés organiques pour croître est avérée chez les espèces issues de milieux dulcicoles ; beaucoup d'entre elles sont néanmoins mixotrophes et

accumulent des cristaux de soufre. Depuis les premières cultures de Pringsheim, de nombreuses tentatives pour cultiver en lithoautotrophie des souches mixotrophes d'eau douce ont échoué (Nelson and Castenholz, 1981 978). La souche D-402, isolée à partir d'un flux d'eau douce, est un des rares contre-exemples. Elle est capable de mixotrophie, mais peut croître de façon strictement lithohétérotrophe, avec des composés soufrés utilisés comme donneurs d'électrons (Grabovich et al., 2001).

Contrairement aux isolats d'eau douce, les souches isolées de *Beggiatoa* marines peuvent croître en micro-aérophilie et de façon lithoautotrophe dans un milieu contenant du H₂S et du CO₂. La matière organique de la souche MS-81-6, par exemple, provient à plus de 90% du CO₂ quand elle croit sur un milieu en gradients H₂S/O₂ contenant du bicarbonate (Nelson and Jannasch, 1983). Comme les souches dulcicoles, elle est pourtant capable d'utiliser la matière organique comme source de carbone et comme donneur d'électrons. Cette versatilité n'est pas partagée par tous les isolats marins : la souche MS-81-1c, par exemple, est un lithoautotrophe obligatoire (Hagen and Nelson, 1996).

La souche MS-81-6 a été la première à être cultivée en lithotrophie grâce à l'utilisation d'un milieu semi-solide (0,2% agar) qui permet de créer des gradients d'hydrogène sulfuré et d'oxygène (Fig. 28) (Nelson and Jannasch, 1983).

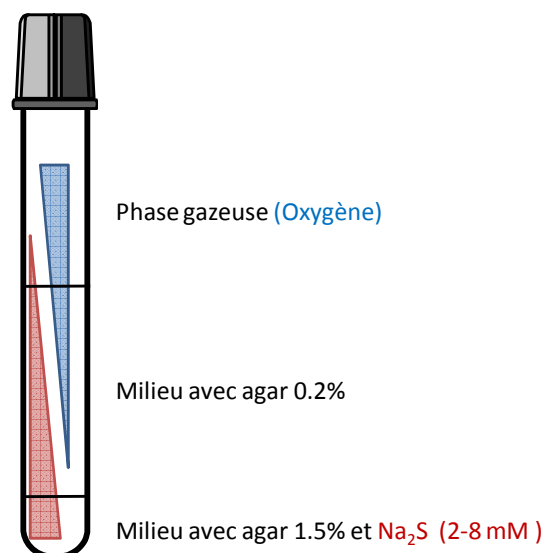


Figure 28. Principe des cultures gélosées développées par Nelson. Le milieu avec agar à 0,2 %, dans lequel se développent les *Beggiatoa*, est le centre de deux gradients inversés : O₂ en provenance de la phase gazeuse (bouchon poreux) et H₂S provenant du milieu gélosé inférieur supplémenté en Na₂S.

Les *Beggiatoa* se développent dans ces cultures gélosées en formant une couche horizontale au niveau de leurs préférences en oxygène et hydrogène sulfuré. La modification des concentrations en ces deux éléments, au cours de la culture, va entraîner le déplacement des *Beggiatoa* dans le milieu gélosé (Nelson and Jannasch, 1983).

Ces étapes d'enrichissement en gradient gélosés sont un passage pratiquement obligatoire pour l'isolement des *Beggiatoa* ; les cultures en batch avec un milieu liquide étant généralement peu propices au développement et à la sélection de ces bactéries (Grabovich et al., 2001). Sans tentative d'enrichissement ou d'isolement en culture pure, les tapis de *Beggiatoa* peuvent être maintenus en vie pendant un certain temps (de quelques jours à deux semaines) dans un aquarium sur leur substrat sédimentaire naturel (Fenchel and Bernard, 1995; Teske and Nelson, 2006).

De part leur capacité à former des biofilms, les *Thiotrichales* ont aussi souvent été observées dans des systèmes de traitement d'eaux. Des cultures en fermenteurs reproduisant les conditions régnant dans ces systèmes ont ainsi permis de cultiver diverses communautés de *Thiotrichales* (Cytryn et al., 2006). Néanmoins, aucune culture ciblant les tapis d'écosystèmes chimiosynthétiques n'a été réalisée à ce jour. Des fermenteurs ont par contre été utilisés avec succès pour le développement de tapis composés majoritairement d'*Arcobacter* et provenant du site hydrothermal situé à 9° sur l'EPR ou du bassin de Guaymas (Taylor et al., 1999; Wirsen et al., 2002).

2. Matériel et méthodes

2.1. Échantillonnages des tapis microbiens

2.1.1. Site d'étude

Le champ hydrothermal de Lucky Strike (1700 m de profondeur) est localisé près du point triple des Açores, le long de la ride Médio-atlantique (31°17'N, 32°16'W). Des tapis microbiens ont été échantillonnés sur les faces Est et Sud de l'édifice Tour Eiffel, durant les campagnes françaises EXOMAR (2005), MoMARETO (2006), MoMAR-08 (2008) et Bathyluck (2009). Ces tapis recouvraient des assemblages de modioles (*B. azoricus*) ou bien des dépôts hydrothermaux dans des zones exposées aux fluides. L'échantillonnage a été réalisé sur les assemblages de moules 1 and 2b, ainsi que sur le substrat 1b tels que définis par Daphnée Cuvelier (Cuvelier et al., 2009) (cf. 1.5.4.). Les conditions physico-chimiques au niveau de ces zones sont présentées ci-dessous.

Tableau 2. Températures, pH et concentrations en ΣS et CH_4 mesurées ou estimées avec leur déviation standard, au niveau de différents habitats définis sur l'édifice de Tour Eiffel (cf. 1.5.4.).

	T°C	ΣS total μM	CH_4 total μm (estimé)	pH (estimé)
Assemblage1	5,08±0,37	1,72±0,73	5,59±0,75	7,03±0,18
Assemblage 2b	4,67±0,14	0,81±0,29	4,76±0,28	7,24±0,09
Substrat 1b	5,5*	x	x	x

*mesure ponctuelle durant l'échantillonnage

2.1.2. Échantillonnages EXOMAR et MoMARETO

Des prélèvements ont été effectués par le PEP (prélèvement d'eau par pompage) du ROV Victor 6000 dans des poches de 5L stériles. Deux types d'échantillons ont été prélevés : des tapis fixés sur des assemblages de modioles et des tapis directement fixés sur des dépôts hydrothermaux. Avant la plongée du ROV, le système de pompage a été lavé deux fois avec du Desibac HPS™ (7 d'Armor), rincé à l'eau stérile puis avec de l'alcool et enfin avec de l'eau de mer stérile. Une fois à bord le contenu des poches a été filtré à 0,2 μm puis les filtres ont été découpés avec un scalpel stérile et conditionnés suivant différentes modalités :

- conservation à -80°C dans des Cryotubes™ Nunc de 2 mL avec de l'eau de mer stérile, pour des études moléculaire de diversité ;

- fixation au formaldéhyde (cf. 2.2.3.), pour des observations par hybridation fluorescente *in situ* (FISH).



Figure 29. Prélèvements de tapis recouvrant des modioles avec le PEP

2.1.3. Échantillonnage MoMAR-08

Des prélèvements ont été effectués avec le PEP du ROV Victor 6000 dans des poches de 5L stériles. Une fois à bord, le contenu des poches a été filtré à 0,2 μm , puis les filtres ont été découpés stérilement et conditionnés suivant différentes modalités :

- conservation à -80°C dans des Cryotubes™ Nunc de 2 mL avec un mélange d'eau de mer stérile et de DMSO (95:5) pour ensemercer de futures cultures ;
- conservation à -80°C dans des Cryotubes™ Nunc de 2 mL avec de l'eau de mer stérile ou du RNeasy Lysis Buffer pour des études moléculaire de diversité ;
- fixation au formaldéhyde (cf. 2.2.3.) pour des observations par FISH.

Ces prélèvements avec le PEP n'ont permis de récolter qu'une faible quantité de matériel, en raison de problèmes techniques (tuyaux bouchés par des particules) et de la difficulté à détacher les tapis microbiens, solidement fixés à leur substrat.

D'autres méthodes de prélèvement ont donc été mises en place. Des modioles et morceaux de cheminées recouverts de tapis ont été prélevés à l'aide du bras robotisé du VICTOR et placés dans des boîtes décontaminées. Ces modioles ont ensuite été grattées au scalpel en champ stérile et les fragments de tapis microbiens récupérés ont été conditionnés suivant différentes modalités :

- utilisation directe (ou bien après dilution) pour ensemercer des cultures ;
- conservation à -80°C dans des Cryotubes™ Nunc de 2 mL avec un mélange d'eau de mer stérile et de DMSO (95:5) pour ensemercer de futures cultures ;
- conservation à -80°C dans des Cryotubes™ Nunc de 2 mL avec de l'eau de mer stérile ou du RNA Later® pour des études moléculaire de diversité ;
- fixation au formaldéhyde (cf. 2.2.3.) pour des observations par FISH ;
- fixation au glutaraldéhyde (cf. 2.2.4.) pour des observations par microscopie électronique.

2.1.4. Échantillonnage Bathyluck

Des modioles recouvertes de tapis ont été prélevées à l'aide du bras robotisé du VICTOR et placées dans des boîtes préalablement décontaminées. Ces modioles ont ensuite été grattées au scalpel en champ stérile et les fragments de tapis microbiens récupérés ont été conditionnés suivant les mêmes modalités que pendant MoMAR-08. Une importante fraction des échantillons a servi à inoculer la culture d'enrichissement de sulfo-oxydantes en fermenteur.

Le système digestif de plusieurs modioles a également été prélevé et conditionné suivant différentes modalités :

- conservation à -80°C dans des Cryotubes™ Nunc de 2 mL avec de l'eau de mer stérile ou du RNAlater® pour des études moléculaire de diversité ;
- fixation au formaldéhyde (cf. 2.2.3.) pour des observations par FISH ;

- fixation au glutaraldéhyde (cf. 2.2.4.) pour des observations par microscopie électronique.

Certaines de ces modioles ont subi un jeûne de 5 ou 6 jours dans de l'eau de mer stérile avant que soit prélevé leur système digestif.

2.2. Observations des tapis *in situ* et par microscopie

2.2.1. Observation *in situ*

Les photographies des tapis microbiens au niveau de l'édifice Tour Eiffel ont été prises avec l'appareil photo numérique du ROV Victor 6000 au cours des campagnes océanographiques françaises EXOMAR (2005), MoMARETO (2006), MoMAR-08 (2008) et Bathyluck (2009).

2.2.2. Microscopie photonique et par contraste interférentiel différentiel

Des fragments de tapis microbiens conservés pour le FISH (voir ci-après) ont été observés sur lames avec un microscope Zeiss Imager Z.2 par microscopie photonique et par microscopie à contraste interférentiel différentiel.

2.2.3. Hybridation Fluorescente *in situ*

Les observations des tapis microbiens par FISH ont été réalisées d'après le protocole mis au point par Sébastien Duperron et Lucile Durand (le protocole complet avec la préparation des solutions nécessaires est présenté en Annexe 1). Les observations ont été effectuées à l'aide du microscope Zeiss Imager Z.2 équipé de la source HXP 120C et des modules colibri et apotome.

Les échantillons ont rapidement été conditionnés après leur prélèvement dans un mélange eau de mer et formaldéhyde 3% pendant 3h, puis conservés dans un tampon éthanol/PBS (1/1). Les fragments de tapis et les glandes digestives de moules ont été inclus dans une

résine composée de polyéthylène glycol et d'hexadecanol (90/10). Des coupes de 6 et 8 µm ont été réalisées à partir de ces blocs d'inclusions à l'aide d'un microtome. Ces coupes ont été montées sur lame et conservées à -20°C en attendant leur utilisation. Avant l'hybridation, la résine a été dissoute par 3 bains successifs de 5 min dans de l'éthanol à 95°C et les échantillons ont été partiellement réhydratés dans une solution d'éthanol à 70 %. 30 µL d'un tampon d'hybridation (25-40 % de formaldéhyde) contenant une ou deux sondes (Tableau 3) ont été déposés sur chaque échantillon. Les lames ont été placées 3 h à 46°C pour permettre aux sondes de s'hybrider. Ces lames ont ensuite été plongées 15 min à 48°C dans une solution de rinçage puis brièvement dans de l'eau MilliQ. Une fois sèches, 1 goutte de milieu de montage (SlowFade® Gold, Invitrogen) contenant du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) a été déposée sur chaque échantillon. Sur chaque lame une lamelle (24x50mm) a été posée puis lutée ; l'ensemble a été conservé à -20°C avant observation.

Tableau 3. Sondes FISH utilisées

Sondes	Fluorochrome	Séquences : 5'→3'	Groupe ciblé	Référence
eub338	Cy3 Cy5	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	(Amann et al., 1990)
arch915	Cy3	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	<i>Archaea</i>	(Stahl and Amann, 1991)
epsi549	Cy3	CAGTGATTCCGAGTAACG	<i>Epsilonproteobacteria</i>	(Lin et al., 2006)
gam42a	Cy3	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacteria</i>	(Manz et al., 1996)
CF319	Cy3	TGGTCCGTGTCTGAGTAC	<i>Bacteroidetes</i>	(Manz et al., 1996)
Bthio-193	Cy3	CGAAGATCCTCCACTTTA	symbionte thiotrophe de <i>Bathymodiolus sp.</i>	
BMARm-845	Cy3	GCTCCGCCACTAAGCCTA	symbionte	(Duperron et al., 2006;
BMARm-845	Alexa 488	GCTCCGCCACTAAGCCTA	méthanotrophe de	Duperron et al., 2007)
BangM-138	Cy3	ACCAGGTTGTCCCCACTAA	<i>Bathymodiolus sp.</i>	
Bmeth-1291	Cy3	GCAATCCGGACTAAGATCG		

2.2.4. Observations par microscopie électronique à balayage (MEB)

Les échantillons ont été immergés 12 à 16h à 4°C dans une solution fixatrice de glutaraldéhyde et eau de mer à un pH de 7,4 (pour 100 mL de solution de fixation : 70 ml d'eau de mer filtrée à 0,45 µM, 20 ml d'eau distillée, 10 ml de glutaraldéhyde à 25%). Les

échantillons ont ensuite été placés dans une solution de rinçage pour conservation : 150 mL d'eau de mer filtrée à 0,45 µm et 0,065 g de sodium azide (NaN₃).

La préparation des échantillons fixés et la mise en œuvre du microscope ont été réalisées par Philippe Crassous (Laboratoire Environnements Profonds, Ifremer).

2.3. Caractérisation phylogénétique et fonctionnelle des tapis microbiens du site de Lucky Strike

2.3.1. Extraction de l'ADN et amplification par PCR

Les ADN totaux ont été extraits avec le FastDNA® Pro soil direct kit (Qbiogene, Inc, CA) suivant le protocole du fabricant modifié par Gordon Webster et Erwan Roussel (Webster et al., 2003; Roussel et al., 2008).

La diversité phylogénétique basée sur le gène codant pour l'ARNr 16S a été caractérisée à l'aide du couple d'amorces universelles E8F/U1942R pour les *Bacteria* et du couple A8F/U1492R pour les *Archaea* (toutes les amorces utilisées au cours de ces études sont résumées dans le tableau 4).

La diversité fongique a été caractérisée à l'aide de couples d'amorces ciblant le gène codant l'ARN r18S de ces populations : EF4/EF3 et EF4/fung5.

La présence de populations sulfo-oxydantes a été recherchée grâce à deux couples d'amorces : APS1F/APS4R et Sox432F/Sox1446R, spécifiques, respectivement, du gène *aprA*, codant pour la sous unité alpha de l'adénosine 5'phospho-sulfate réductase et du gène *soxB*, codant pour un élément du complexe enzymatique d'oxydation du thiosulfate.

Les populations oxydant le méthane ont été recherchées avec le couple d'amorces A189F/MB661R, spécifique du gène *pmoA* codant pour la méthane monooxygénase particulaire.

Enfin, les populations fixant le carbone inorganique ont été ciblées par l'utilisation de trois combinaisons d'amorces : cbbLF/cbbLR, cbbMF/cbbMR/cbbMR et acIB892F/acIBR, spécifiques des gènes codant les formes 1 et 2 de la RuBISCO, ainsi que la sous-unité β de l'ATP-citrate lyase.

Des amorces spécifiques du gène codant pour l'ARNr 16S des symbiontes de *Bathymodiolus* sp. (Boutet, en préparation), basées sur les sondes spécifiques des ces symbiontes pour la réalisation d'hybridation *in situ* (Duperron et al., 2007) ont également été testées : le couple Meth138F/Meth845R pour les symbiontes méthanotrophes et le couple Sulfo195F/Sulfo642R pour les symbiontes thiotrophes.

L'ADN a été amplifié dans un mélange réactionnel de 25 µL contenant : 5 µL de tampon 5X GoTaq® Flexi (Promega), 1,5 µL d'une solution à 25 mM de MgCl₂, 0,2 µL d'une solution à 10mM de dNTPs, 0,1 µL d'une solution à 100 pM de chaque amorce et 0,12 µL de polymérase GoTaq® Flexi (Promega) à 5U.µL⁻¹.

2.3.2. Extraction des ARN totaux et amplification par RT-PCR

Les ARN totaux ont été extraits avec le FastRNA® Pro soil direct kit (Qbiogene, Inc, CA) suivant les instructions du fabricant. Le produit d'extraction a été incubé 1 h à 37°C avec 18U de TURBO DNase® (Ambion™) dans du tampon TURBO DNase® à 1X. La digestion de l'ADN a été stoppée par l'ajout d'EDTA (concentration finale de 15 mM) et un passage de 10 min à 65°C, avant une étape de purification avec le RNeasy minikit (Qiagen™), suivant les instructions du fabricant. L'absence d'ADN a été contrôlée par PCR directe.

La transcription inverse des ARN d'intérêt et leur amplification ont été réalisées avec le kit OneStep RT-PCR (Qiagen™), suivant les instructions du fabricant. Les mêmes couples d'amorces que pour les amplifications par PCR directes ont été utilisés, à l'exception des couples d'amorces universelles ciblant le gène de l'ARNr 16S : ici le couple E8F /907R a été utilisé pour le domaine des *Bacteria* et le couple A8F/U907R pour les *Archaea* (Tableau 4).

Les conditions de PCR sont les mêmes que celles indiquées dans les publications de référence, mais elles sont précédées d'une étape de transcription inverse (30 min à 50°C) suivie d'une étape d'activation (15 min à 95°C).

Tableau 4. Amorces utilisées lors de l'étude

Désignation	Groupe ciblé	Séquence 5'-3'	Référence
U1492 R	16S rDNA universel	GTT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT	(Lane, 1991)
E8 F	16S rDNA bactérien	AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG	
A8 F	16S rDNA archéens	CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA-3'	(Kolganova et al., 2002)
U 907 R	16S rDNA universel	CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT	(Lane et al., 1985)
Meth138F	symbionte méthanotrophe de	TCT-GCC-TAT-TAG-TGG-GGG-ACA-ACA-TGG-T	(Boutet, en préparation)
Meth845R	<i>Bathymodiolus</i> sp.	GCT-CCG-CCA-CTA-AGC-CTA-TAA-ATA-GAC-C	
Sulfo195F	symbionte thiotrophe de	CTC-TAT-GGA-GTA-AAG-TGG-AGG-ACC-TTC-G	
Sulfo642R	<i>Bathymodiolus</i> sp.	CCT-ATA-CTC-TAG-TTT-GCC-AGT-TTC-AA	
<i>cbbL_1b</i> F	RuBisCO forme 1	CAC-CTG-GAC-CAC-VGT-BTG-G	(Blazejak et al., 2006)
<i>cbbL_2c</i> R	RuBisCO forme 1	CGG-TGY-ATG-TGC-AGC-AGC-ATI-CCG	
<i>cbbM1_Els</i> F	RuBisCO forme 2	ATC-ATC-AAR-CCS-AAR-CTS-GGC-CTG-CGT-CC	
<i>cbbM_2b</i> R	RuBisCO forme 2	MGA-GGT-SAC-SGC-RCC-RTG-RCC-RGC-MCG-RTG	
<i>cbbM2_Els</i> R	RuBisCO forme 2	MGA-GGT-GAC-SGC-RCC-GTG-RCC-RGC-MCG-RTG	
<i>acIB</i> 892 F	ATP-citrate lyase β sub-unit	TGG-ACM-ATG-GTD-GCY-GGK-GGT	
<i>acIB</i> R	ATP-citrate lyase β sub-unit	ATA-GTT-KGG-SCC-ACC-TCT-TC	(Meyer and Kuever, 2007b)
APS1 F	adénosine 5'phospho-sulfate	TGG-CAG-ATC-ATG-ATY-MAY-GG	
APS4 R	réductase alpha-sub-unit	GCG-CCA-ACY-GGR-CCR-TA	
<i>soxB432F</i>	composant <i>SoxB</i> du complexe enzymatique périplasmique d'oxydation du thiosulfate	GAY-GGN-GGN-GAY-CAN-TGG	
<i>soxB693F</i>		ATC-GGN-CAR-GCN-TTY-CCN-TA	
<i>soxB1164R</i>		AAR-TTN-CCN-CGN-CGR-TA	
<i>soxB1446R</i>		CAT-GTC-NCC-NCC-RTG-YTG	
A189 F	méthane mono-oxygénase particulaire	GGN-GAC-TGG-GAC-TTC-TGG	(Holmes et al., 1995)
MB661 R		CCG-GMG-CAA-CGT-CYT-TAC-C	
EF4		GGA-AGG-GG[G/A]-TGT-ATT-TAT-TAG	
EF3	18S rDNA fongique	TCC-TCT-AAA-TGA-CCA-AGT-TTG	(Smit et al., 1999)
fung5		GTA-AAA-GTC-CTG-GTT-CCC-C	

2.3.3. Construction de la banque de clones et séquençage

Avant l'étape de clonage, tous les produits PCR ont été purifiés sur gel avec le Qiaquick® Gel Extraction Kit (Quiagen) suivant les instructions du fabricant. Les banques de clones ont été construites par transformation de cellules d'*E. coli* compétentes avec les kit TOPO XL Cloning

kit (Invitrogen) ou pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). L'extraction des plasmides, leur purification et le séquençage des gènes d'intérêt a été réalisé à la plateforme Biogenouest® à la station biologique de Roscoff (France) et par GATC Biotech, (Konstanz, Germany).

2.3.4. Analyse phylogénétique

L'alignement et l'édition des séquences ont été réalisés avec les logiciels BioEdit 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) et MUSCLE (Edgar, 2004). L'analyse phylogénétique des séquences codant pour l'ARNr 16S a été effectuée grâce aux logiciels PHYLO_WIN (Galtier et al., 1996) et MEGA 4 (Kumar et al., 2008) avec l'algorithme neighbour-joining et la correction à deux paramètres de Kimura. L'analyse phylogénétique des séquences codant pour les gènes de fonction a été réalisée avec les mêmes logiciels et algorithme, mais après leur conversion en séquence d'acides-aminés et avec la correction PAM. La robustesse des embranchements a été testée par bootstrap (1000 au minimum). Les séquences présentant plus de 97% de similarité ont été regroupées au sein du même OTU. Les courbes de raréfaction à 97% de similarité ont été réalisées avec le programme DOTUR (Schloss and Handelsman, 2005).

2.4. Analyse par Q-PCR des communautés bactérienne et archéenne des tapis microbiens.

Pour quantifier de façon relative les communautés des archées et bactéries au sein des tapis microbiens de Lucky Strike, un échantillon a été analysé par PCR quantitative (Q-PCR). L'exécution du protocole et l'analyse des résultats ont été réalisées par Adrien Vigneron (LMEE, Ifremer Brest).

L'échantillon traité provient de la campagne MoMAR-08. Il s'agit d'un échantillon de tapis recouvrant des modioles prélevé par pompage. Après extraction de l'ADN (cf. 2.3.1.) l'amplification a été réalisée avec le couple d'amorces BACT1369F/BACT1492R pour les bactéries et ARC787F/ARC1059R pour les archées (cf. 3.2.2. et Tableau 7). Les courbes

standards ont été réalisées en triplicats par dilution au dixième (de 100 ng/μL à 0,001ng/μL) d'ADN de *Citricella thiooxydans* pour les bactéries et de *Methanoculleus marisnigri* pour les archées.

Les manipulations ont été conduites sur un appareil Applied biosystems 7300 avec les réactifs perfeCta SYBR Green Supermix et Rox de Quanta Biosciences.

2.5. Suivi des populations sulfo-oxydantes en fermenteur

2.5.1. Description du système de culture utilisant le fermenteur gas-lift

Les méthodes de culture en fermenteur permettent de travailler en grand volume et de réguler dans le temps certains paramètres physico-chimiques. Elles rendent également possible le suivi temporel des populations s'y développant. Le fermenteur gas-lift a été développé par le Dr N. Raven (UK) pour la culture de l'archée hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. L'utilisation de ce fermenteur lors de cultures en continu a permis la production de biomasses importantes (Raven et al., 1992b; Raven et al., 1997). Un fermenteur de ce type a été acquis au laboratoire pour la production de biomasse et a ultérieurement été utilisé pour la culture de communautés microbiennes thermophiles (Postec et al., 2005b; Postec et al., 2007; Byrne et al., 2009).

Un certain nombre de modifications a été apporté au schéma expérimental utilisé précédemment dans le laboratoire (Postec et al., 2005b; Godfroy et al., 2006b) afin de l'adapter à la culture des bactéries sulfo-oxydantes des tapis de Lucky Strike (Fig. 30). Lors de l'enrichissement le système était composé comme suit :

- (a) La cuve en colonne (Radley's UK) : hauteur de 425 mm, diamètre interne de 98 mm, volume utile de 2 L. En verre borosilicaté elle possède une double enveloppe permettant le maintien de la culture à la température désirée par circulation d'eau. L'extérieur de la cuve a été recouvert de papier d'aluminium pour maintenir l'obscurité.

- (b) Une platine en téflon fixée sur la partie supérieure de la cuve et comportant différentes entrées :
- une entrée centrale de 12 mm destinée à l'électrode de pH ;
 - deux entrées de 8 mm destinées à la sonde de température et à la sortie de l'effluent gazeux ;
 - huit entrées de 5 mm qui ont été utilisées pour l'addition d'acide et de base, pour le système de prélèvement, pour l'inoculation et pour l'oxygénation du milieu.
- (c) Un système de régulation de la température, composé d'une sonde PT 100 recouverte de Teflon PTFE (Radley, UK) et reliée à un bain-marie programmable (Julabo), qui a permis de maintenir la température de la cuve à 8°C durant la culture.
- (d) Un système de régulation du pH composé d'une électrode stérilisable à gel (Mettler Toledo) et de solutions d'acide (HCl 1 N) et de base (Na₂CO₃ 1 M) stockées dans des flacons Nalgène d'un litre avec bouchon vissant à trois entrées.
- La régulation de pH et de température était assurée par un système analogique de contrôle (Infors, Bottmingen, Switzerland). Ce système était relié à un ordinateur et associé au logiciel Iris®. Il commandait les pompes d'addition d'acide et de base, ainsi que le bain-marie afin d'ajuster les valeurs mesurées aux consignes fixées par l'expérimentateur. Il a permis d'acquérir et de stocker l'ensemble des paramètres mesurés au cours de la fermentation.
- (e) Un système de balayage gazeux qui a permis d'agiter le milieu (pour favoriser la génération de biofilms) mais également d'approvisionner la culture en H₂S. L'arrivée de gaz passait par un diffuseur en verre fritté fixé au fond de la cuve. Ce diffuseur était relié à un débitmètre à bille (Aalborg, Monsey, New York) par l'intermédiaire d'un tuyau Pharmed (Masterflex, Norton) et d'un filtre 0,22 µm Acro50 (Gelman), relié à l'arrivée de gaz.
- (f) Une pompe d'aquarium a été ajoutée au système pour alimenter le système en air via un diffuseur placé dans la partie supérieure de la cuve. L'arrivée d'air par le haut de la cuve et d'N₂ enrichi en H₂S par le bas a permis de créer un milieu hétérogène et dynamique s'approchant des conditions environnementales.

- (g) Des billes de verre stériles ainsi que des substrats poreux (pierres ponces artificielles), placés dans la cuve afin de permettre la fixation des bactéries formatrices de biofilms.
- (h) Un tuyau d'évacuation des gaz relié à un flacon contenant une solution de soude 10N qui a permis de piéger l'H₂S.

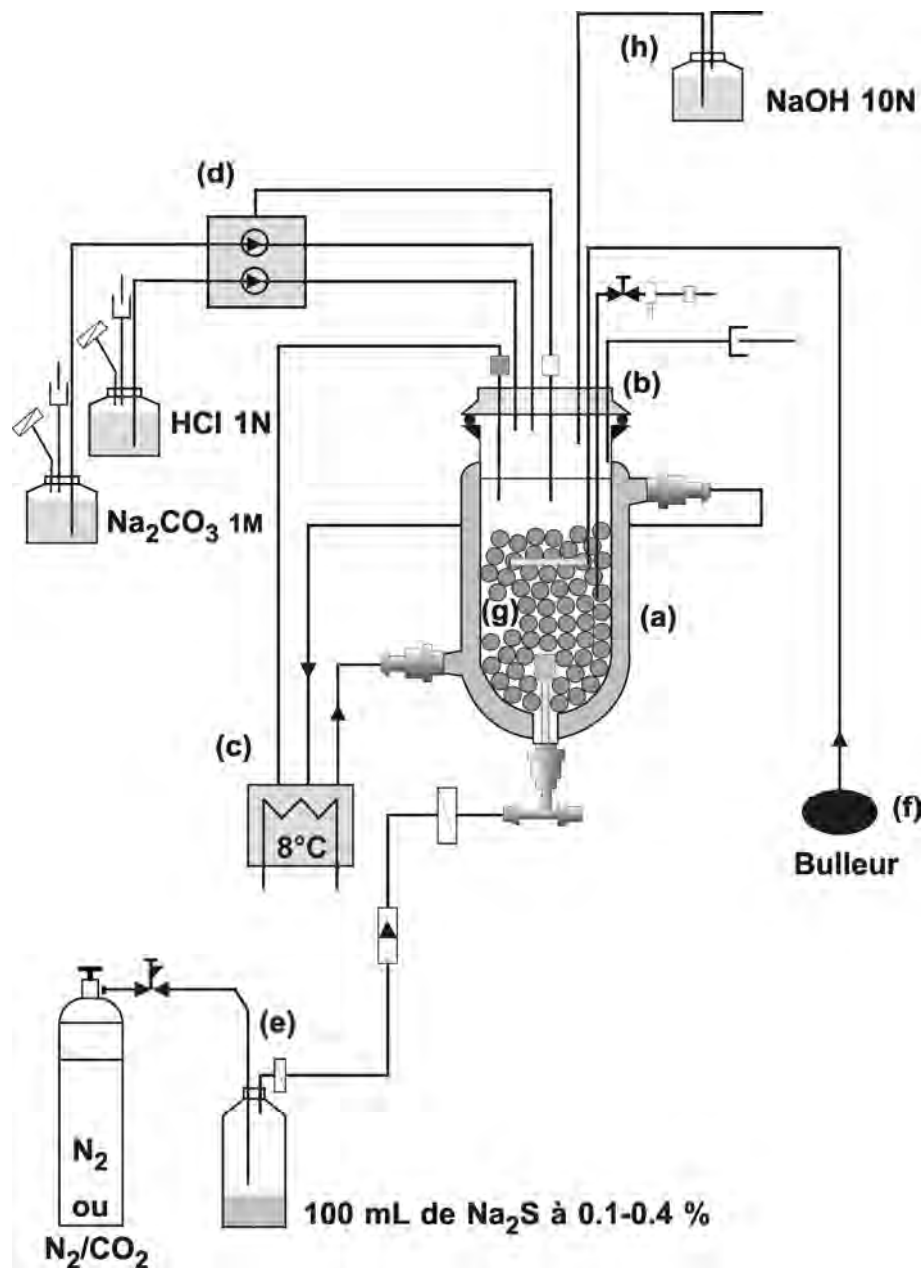


Figure 30. Schéma du système expérimental mis en place.

2.5.2. Conditions de culture

❖ Conditions générales

La culture d'enrichissement a été réalisée à 8°C, dans l'obscurité et sur une période de 85 jours : à bord du navire océanographique *Pourquoi Pas ?* des jours 1 à 33, puis au laboratoire LMEE (Ifremer) des jours 30 à 85 (Tableau 5). Le pH a été maintenu entre 7 et 7,1 pendant toute la durée de la culture.

❖ Balayage gazeux et apport d'hydrogène sulfuré

Un faible balayage gazeux (50 mL.min⁻¹) a été appliqué à cette culture afin de ne pas générer d'anaérobiose, de limiter les forces de cisaillement et de ne pas empêcher la fixation des espèces formant les tapis. Pour des raisons pratiques, ce balayage a été réalisé avec du N₂ durant les jours 1 à 33 de la culture (à bord du navire *Pourquoi Pas ?*), puis avec un mélange N₂/CO₂ (95:5) (Camp and Sublette, 1992) une fois le fermenteur transféré au laboratoire (jours 34 à 85). L'absence de source de carbone inorganique durant le temps de culture à bord du *Pourquoi Pas ?* a été palliée par l'utilisation d'un milieu de culture supplémenté en NaHCO₃ (6mM). Pour approvisionner le milieu en H₂S, nous avons fait passer le flux de gaz par un flacon Nalgène d'un litre, contenant 100 mL d'une solution de Na₂S à 0,1-0,4 % (w/vol) (Wirsen et al., 2002). Le flux gazeux entraînait au passage le H₂S émis par la solution de Na₂S, qui a permis d'enrichir le milieu en H₂S de façon progressive et continue. La solution contenue dans le flacon était renouvelée chaque jour et sa concentration en Na₂S a été adaptée suivant la consommation de ce dernier par les micro-organismes sulfo-oxydants (Tableau 5). Pour cela, la présence de Na₂S dans le milieu a été vérifiée quotidiennement à l'aide de bandelettes d'acétate de plomb (Whatman©).

❖ Inoculations

Deux inoculations ont été réalisées : la première à J1 avec 3g de tapis remis en suspension dans 30 mL de milieu MJ4 pour fermenteur (cf. Annexe 2) et la deuxième à J20 avec 5 g de tapis en suspension. L'absence visuelle de développement de bactéries filamenteuses et l'opportunité d'un nouveau prélèvement d'échantillon frais pendant la campagne Bathyluck ont motivé cette deuxième inoculation.

❖ Renouveaulement du milieu

Du milieu frais a été ajouté chaque jour de façon séquentielle pour compenser les prélèvements et renouveler le milieu : 50 mL, 100 mL ou 200 mL par jour (Tableau 5) en fonction des densités cellulaires observées. Ces volumes correspondent à des renouvellements de 3,5 %, 7 % et 14 % du volume total du milieu de culture.

❖ Rapatriement du fermenteur

Après la fin de la campagne océanographique Bathyluck (33 jours après le début de la culture), le fermenteur a été rapatrié au laboratoire pour continuer la culture d'enrichissement. Le balayage gazeux ainsi que la régulation des pH et température ont été arrêtés moins de 2 heures et seule une augmentation de 2,6°C de la température a été constatée. Malheureusement, suite au transport, la régulation de température a présenté un dysfonctionnement durant une douzaine d'heures, ce qui a entraîné une augmentation de la température jusqu'à 20,4°C.

Tableau 5. Synoptique de la culture

Jour	Événements	Lieu de culture et balayage gazeux	[Na ₂ S] dans la solution	Renouvellement du milieu (en mL/jour)
1	Inoculation du fermenteur (3 g de tapis en suspension)	à bord du <i>Pourquoi Pas ?</i> Balayage avec du N ₂	0,1 %	50
4	Prélèvements pour analyses moléculaires Modification du taux de renouvellement du milieu			100
6	Modification de la quantité de Na ₂ S dans la solution			
8	Prélèvements pour analyses moléculaires			
12	Prélèvements et pour analyses moléculaires			
14	Modification de la quantité de Na ₂ S dans la solution			
16	Prélèvements pour analyses moléculaires			
20	Deuxième inoculation (5 g de tapis en suspension)			
21	Prélèvements pour analyses moléculaires Modification du taux de renouvellement du milieu			
31	Prélèvements pour analyses moléculaires		au LMEE Balayage avec du N ₂ /Co ₂	0,4%
33	Transfert du fermenteur			
33-34	Arrêt du bain-marie : la culture monte à 20,4°C			
38	Prélèvements pour analyses moléculaires			
44	Prélèvements pour analyses moléculaires			
50	Prélèvements pour analyses moléculaires			
61	Prélèvements pour analyses moléculaires			
71	Prélèvements pour analyses moléculaires			
85	Prélèvements pour analyses moléculaires			

2.5.3. Prélèvement d'échantillons

Des échantillons de la culture d'enrichissement en fermenteur ont été prélevés quotidiennement sur toute la durée de la fermentation et traités en fonction de leur utilisation future :

- 2 tubes de 15 mL de culture ont été congelés à -80°C en présence d'un cryoprotecteur (5% de dimethyl sulfoxyde : DMSO) pour réaliser des sous-cultures et des isolements (cf. 2.5.5.) ;
- 2-4 tubes de 15 mL de culture ont été conservés à -80°C en vue d'extraction d'acides nucléiques ;
- 1-2 tubes 10 mL de culture ont été fixés pendant 2 h en présence de formaldéhyde 3%. Le culot de cellules fixées a été récupéré par centrifugation (30 min à 8000 g) puis suspendu à nouveau dans 800 µL de tampon PBS/éthanol (1/1) et placé à -20°C.

2.5.4. Analyses moléculaires

La diversité des populations bactériennes et archéennes actives au sein du fermenteur a été recherchée par RT-PCR avec les couples d'amorces universelles *Bacteria* E8F/907R et *Archaea* A8F/915R, ciblant le gène de l'ARNr 16S. Pour caractériser la diversité bactérienne 12 banques de clones, comptant 16 à 24 clones chacune, ont été construites à partir de prélèvements réalisés à : 4, 8, 12, 16, 21, 31, 38, 44, 49, 60, 71 et 85 jours après la première inoculation (Tableau 5). Aucune banque de clones n'a été construite avec les amorces *Archaea* car aucun fragment génomique n'a été amplifié.

Les populations sulfo-oxydantes ont été caractérisées par PCR directes avec les couples APS1F/APS4R et Sox432F/Sox1446R. Pour chacun des couples d'amorces, une banque de clones (42 et 50 clones) a été construite sur des prélèvements réalisés quatre jours après la première inoculation.

La diversité des populations sulfo-oxydantes actives au cours de la fermentation a été recherchée par RT-PCR avec les mêmes couples d'amorces. Pour chacun des couples, 12 banques de clones, de 7 à 10 clones, ont été construites à partir de prélèvements réalisés à : 4, 8, 12, 16, 21, 31, 38, 44, 49, 60, 71 et 85 jours après la première inoculation (Tableau 5).

Les populations fixant le carbone inorganique ont été ciblées par PCR directes avec les combinaisons d'amorces : cbbLF/cbbLR, cbbMF/cbbMR/cbbMR et acIB892F/acIBR. Pour chacun des couples d'amorces, une banque de clones (30 à 44 clones) a été construite sur des prélèvements réalisés quatre jours après la première inoculation.

La diversité des populations autotrophes actives a été recherchée par RT-PCR avec les mêmes couples d'amorces. Pour chacun des couples, 12 banques de clones, de 7 à 9 clones, ont été construites à partir de prélèvements réalisés à : 4, 8, 12, 16, 21, 31, 38, 44, 49, 60, 71 et 85 jours après la première inoculation (Tableau 5).

2.5.5. Dénombrement cellulaire et isolements

La densité cellulaire de chaque échantillon a été déterminée par comptage direct des cellules en utilisant une cellule de Thoma (0,02 mm de profondeur) et un microscope Olympus BX60 à contraste de phase (X400).

Des sous-cultures ont été réalisées en fiole pénicilline avant de tenter d'isoler des micro-organismes détectés dans les cultures d'enrichissement. Le milieu d'enrichissement MJ4, additionné de 6 mM NaHCO₃ (cf. Annexe 2) a été utilisé.

Des dilutions en série ont été effectuées en inoculant 19 mL de milieu en fiole pénicilline de 50 mL avec 1 mL de culture d'enrichissement (dilution au 20^{ème}). Sept dilutions successives au 20^{ème} ont été réalisées. En théorie, la culture observée pour la dilution la plus importante correspond à une souche isolée.

Des isolements par étalement sur boîte ont également été réalisés à partir des sous-cultures et des dilutions. Le milieu de culture MJ4 a été additionné d'un agent gélifiant : agar à 1,5%. L'inoculum a, soit été étalé à la surface du milieu gélosé, soit incorporé au milieu en surfusion (30-40°C) juste avant de couler la boîte, aussitôt refroidie sur glace. Toutes les cultures ont été réalisées dans l'obscurité et à une température de 8°C.

2.5.6. Suivi par hybridation fluorescente *in situ*

Des gouttes (environ 25 µL) de tampon PBS/éthanol contenant les cellules fixées (cf. 2.5.3.) ont été placées sur des lames Superfrost® Plus (Roth, Germany). Après avoir été séchées (45 min à 30 °C), les lames ont été plongées successivement dans 3 bains d'éthanol (50%, 80% et 100 %), pendant 5 min pour déshydrater les échantillons. L'hybridation a été réalisée comme expliqué précédemment (cf. 2.2.3.).

2.6. Cultures d'enrichissement réalisées pendant les campagnes MoMAR-08 et Bathyluck.

2.6.1. Cultures réalisées à partir d'échantillons de MoMAR-08

Des cultures d'enrichissement des populations sulfo-oxydantes et méthanotrophes, utilisant différents types de milieux (Tableau 6 et Annexe 2), ont été mises en place au cours de la campagne MoMAR-08 à bord du navire océanographique l'Atalante. Elles ont été réalisées en fioles pénicillines de 50 mL ou bien en tubes Hungate pour les milieux MMJHS et pour les milieux gélosés en gradient. L'inoculation a été réalisée avec un fragment de tapis ou bien avec 0,1 mL d'une solution de 10 mL du milieu adéquat contenant environ 0,2 g de tapis humide.

Les cultures ont été incubées dans la chambre froide du navire à 11°C, dans l'obscurité, durant un mois ; elles ont été placées à 4°C une fois rapatriées au laboratoire. En fonction des densités cellulaires observées, les cultures ont été repiquées dans du milieu frais. Des dilutions en série ainsi que des isolements par étalement sur boîte ont été effectuées (cf. 2.5.5.).

Tableau 6. Milieux de culture ensemencés lors de la campagne MoMAR-08

Désignation et spécificité	Référence
Milieu gélosé autotrophe pour <i>Beggiatoa</i>	(Nelson and Jannasch, 1983; Hagen and Nelson, 1996)
Milieu gélosé autotrophe pour <i>Beggiatoa</i> à partir d'une base minérale SME	adapté d'après Nelson et Hagen (Nelson and Jannasch, 1983; Hagen and Nelson, 1996)
Milieu selon Grabovitch pour filamenteuses	(Grabovich et al., 2001)
Milieu ANMS pour méthanotrophes	(Whittenbury et al., 1970)
Fluide hydrothermale dilué et CH ₄ pour méthanotrophes	Annexe 2
MJmet pour méthanotrophes	(Hirayama et al., 2007)
MMJHS pour sulfo-oxydantes	(Hirayama et al., 2007)
Milieu 113 pour <i>Thiobacillus</i>	DSMZ
Milieu selon Teske pour sulfo-oxydantes	(Teske et al., 2000)
Milieu pour <i>Nitrosopumilus maritimus</i>	(Konneke et al., 2005)

2.6.2. Cultures réalisées à partir d'échantillons de Bathyluck (2009)

Des milieux gélosés en gradient ont été réalisés pour l'enrichissement de bactéries filamenteuses de type *Beggiatoa* marines. Le milieu MJ4 supplémenté en NaHCO₃ a été utilisé (cf. Annexe 2). Les gradients ont été réalisés dans des tubes falcons de 50 mL. Seize conditions de culture différentes ont été testées (Fig. 31) et chacune de ces variantes a été réalisée à pH 6,5 et 7. L'inoculation a été effectuée avec un fragment de tapis et les cultures ont été incubées à 8°C dans le noir. Des repiquages fréquents ont été faits à partir des cultures présentant encore des *Beggiatoa* non lysées.

Des cultures d'enrichissement de populations lithoautotrophes utilisant les milieux pour sulfo-oxydantes selon Teske et Grabovich (Teske et al., 2000 ; Grabovich et al., 2001), ainsi que les milieux pour méthanotrophes ANMS et MJmet (Tableau 5), ont également été réalisées en fioles pénicillines de 50 mL. L'inoculation a été réalisée avec un fragment de tapis. Les fioles pénicillines ont été scellées stérilement après l'inoculation. Les cultures ont été incubées à 8°C dans l'obscurité. La présence de micro-organismes sulfo- et méthano-oxydants a été vérifiée par PCR directes avec les couples d'amorces A189F/MB661R, APS1F/APS4R et Sox432F/Sox1446R. Des dilutions en série ainsi que des isolements par étalement sur boîte ont été effectués à partir des cultures positives aux tests PCR (cf. 2.5.5.).

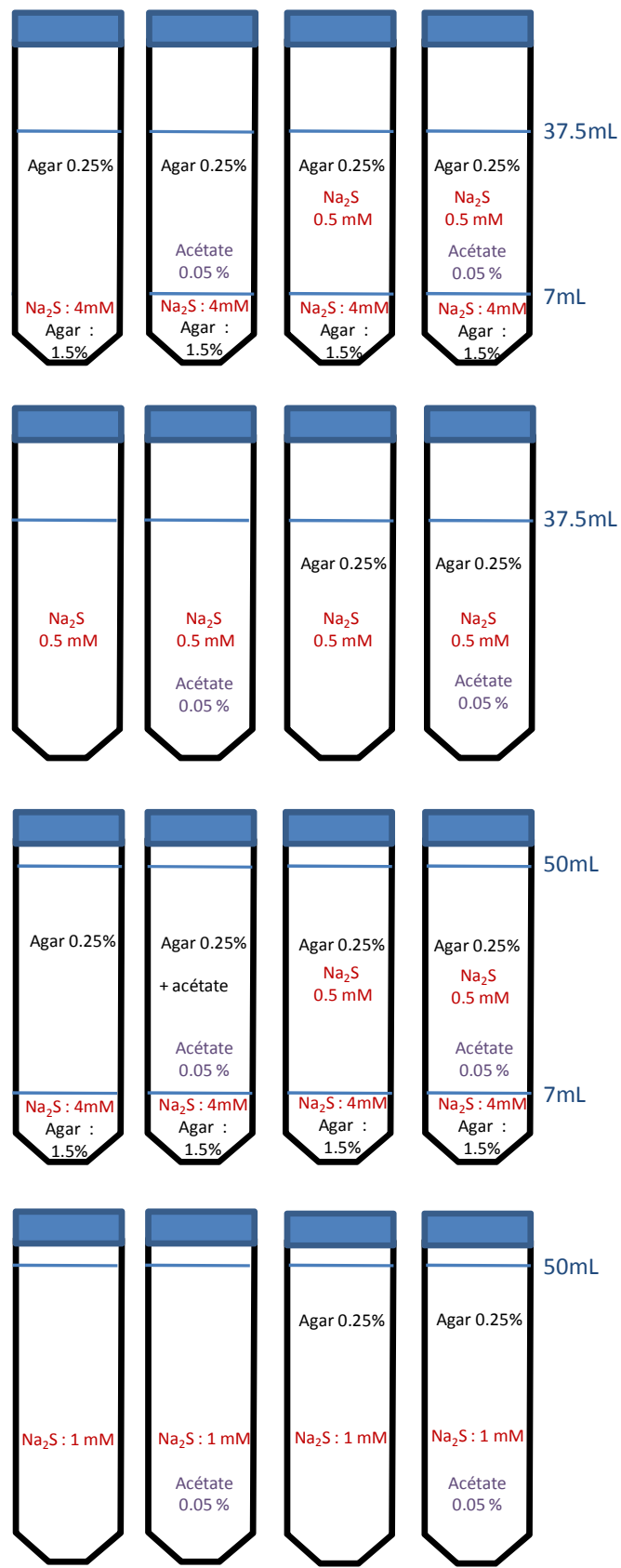


Figure 31. Représentation des différentes conditions de culture en gélose testées

3. Résultats

3.1. Diversités phylogénétique et fonctionnelle des tapis microbiens du site hydrothermal de Lucky Strike (MAR).

Le site de Lucky Strike, découvert en 1992 lors de la campagne américaine FAZAR, est situé sur le point triple des Açores (37,29°N ; 32,28°W) à une profondeur d'environ 1650-1700 mètres (Lee Van Dover et al., 1996; Sarradin et al., 1999). La faune de Lucky Strike est dominée par des modioles (*Bathymodiolus azoricus*), qui recouvrent les structures hydrothermales actives ou bien sont disposées autour de zones à travers lesquelles le fluide hydrothermal diffuse. Ces modioles sont associées à des bactéries endosymbiotiques thiotrophes et méthanotrophes (Duperron et al., 2006). Les tapis microbiens, très présents sur le site de Lucky Strike, recouvrent la plupart des communautés de modioles, ainsi que certaines zones de dépôts hydrothermaux non colonisées par ces communautés, mais cependant sous l'influence du fluide. Ces tapis sont composés majoritairement de grandes bactéries filamenteuses affiliées, d'après leur morphologie et la présence de granules de soufre, à des *Thiotrichales* des genres *Beggiatoa* et *Thiothrix* (Teske and Nelson, 2006).

La diversité phylogénétique de ces tapis, ainsi que les populations métaboliquement actives, ont été caractérisées par des méthodes de biologie moléculaire. Les ADN et ARN totaux d'échantillons de tapis recouvrant des dépôts hydrothermaux ou bien des assemblages de modioles ont été extraits. Des amplifications par PCR (Polymerase Chain Reaction) et RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) ont ensuite été réalisées avec des couples d'amorces spécifiques du gène de l'ARN ribosomal 16S bactérien ou archéen. La diversité archéenne observée était restreinte aux *Thaumarchaeota* marines du groupe 1. Parmi ce phylum, presque toutes les séquences obtenues étaient affiliées à l'espèce *Nitrosopumilus maritimus* (99 % de similarité) et plus lointainement aux espèces géantes *Thaumarchaeota karukerense* et *Thaumarchaeota insulaporcus* (Muller et al., 2010). À l'inverse, la banque de clones bactériens a montré une diversité importante, dominée par les *Proteobacteria*. Les classes *Gamma* et *Epsilon* de ce phylum étaient les plus représentées (respectivement 29% et 25% du nombre total de clones), mais des représentants des classes *Alpha* et *Delta* étaient aussi présents (11% et 3%). Un nombre important (25%) de phylotypes affiliés au groupe des *Bacteroidetes* a également été obtenu, ainsi que des séquences correspondant à différents phyla : *Planctomycetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Actinomycetes* et *Verrucomicrobia*. Les clones

bactériens obtenus par RT-PCR étaient pour leur grande majorité affiliés à des *Thiotrichales* de genre *Beggiatoa* proches de celles identifiées sur le site hydrothermal côtier de White Point, Californie (Kalanetra et al., 2004). Ce phylotype semble constituer la population la plus active de nos échantillons.

Des amplifications par PCR et RT-PCR ont également été réalisées avec des couples d'amorces spécifiques de gènes impliqués :

- dans la fixation autotrophe du carbone, avec les gènes *cbbL* et *cbbM* codant pour les formes 1 et 2 de la RuBisCO, ainsi que le gène *acIB* codant pour la sous-unité β de l'ATP-citrate lyase ;
- dans l'oxydation du méthane, avec le gène *pmoA* qui code pour la méthane mono-oxygénase particulaire ;
- dans l'oxydation des composés soufrés avec les gènes *aprA*, codant pour la sous-unité alpha de l'adénosine-5'-phosphosulfate et *soxB* codant pour la sous unité B du complexe enzymatique de la sulfite-oxydase.

Les banques de clones construites grâce à ces amorces ont mis en évidence la présence de *Proteobacteria* lithotrophes et autotrophes actives, complétant la diversité phylogénétique obtenue avec les amorces spécifiques du gène de l'ARN ribosomal 16S.

Pour approfondir la compréhension des relations entre les tapis et les moules de Lucky Strike, nous avons utilisé de nouvelles amorces spécifiques du gène de l'ARN ribosomal 16S des endosymbiontes de *Bathymodiolus* (Boutet, en préparation). Ces amorces nous ont permis – par PCR et RT-PCR – de mettre en évidence, dans les banques de clones générées, des signatures étroitement affiliées aux symbiontes thiotrophes et méthanotrophes de *Bathymodiolus azoricus*. Les résultats obtenus semblent indiquer que des symbiontes vivants sont présents dans les tapis microbiens du site de Lucky Strike.

Les résultats obtenus font l'objet d'un article qui a été soumis au journal «FEMS Microbiology». Le document soumis est présenté ci-après.

1 Diversity and function in microbial mats from the Lucky 2 Strike vent field

3 Crépeau Valentin¹, Cambon Bonavita Marie-Anne¹, Lesongeur Françoise¹,
4 Randrianalivelo Henintsoa¹, Sarradin Pierre-Marie², Sarrazin Jozée², and
5 Godfroy Anne¹

6 ¹IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR6197,
7 Centre de Brest–BP70, Plouzané, France; ²IFREMER, Laboratoire Environnements
8 Profonds, Centre de Brest–BP70, Plouzané, France.

9 Summary

10 Diversity and metabolically active populations in microbial mats from the Lucky Strike
11 vent field (Mid-Atlantic Ridge) were investigated through molecular approaches. DNA
12 and RNA were extracted from mats samples covering hydrothermal deposits and
13 *Bathymodiolus azoricus* mussel assemblages. We analyzed 16S ribosomal RNA
14 gene sequences and sequences of functional genes involved in autotrophic carbon
15 fixation: form 1 and 2 RuBisCO (*cbbL/M*), ATP-citrate lyase B (*acI/B*); methane
16 oxidation: particulate methane monooxygenase (*pmoA*) and sulfur oxidation:
17 adenosine-5'-phosphosulfate (*aprA*) and *soxB*. To obtain new insights into the
18 relationships between mats and mussels, new domain-specific *Bathymodiolus* sp.
19 symbionts 16S rRNA gene primers were also used. All archaeal sequences identified
20 were affiliated to the Marine *Thaumarchaeota* Group 1. In contrast, analyses of
21 bacterial sequences revealed a considerably higher diversity even if the
22 *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* phyla were dominant. Sequences identified in the
23 RNA library revealed that species affiliated to *Beggiatoa* were the dominant active
24 population. DNA and RNA functional gene libraries analyses revealed the diversity
25 and activity of chemolithoautotrophic population. Most of these sequences were
26 affiliated to *Gammaproteobacteria* including hydrothermal fauna symbionts,
27 *Thiotrichales* and *Methylococcales*. PCR and RT-PCR using the *Bathymodiolus* sp.

28 symbionts 16S rRNA gene primers revealed sequences affiliated to both
29 methanotrophic and thiotrophic endosymbionts.

30 **Introduction**

31 Microbial mats – layered biofilms containing different types of cells – are complex
32 systems in which representatives of various groups of organisms are observed
33 occurring together in various ecosystems. Among them are *Cyanobacteria* and
34 eukaryotic phototrophs, aerobic heterotrophic and chemoautotrophic bacteria,
35 protozoa, anoxygenic photosynthetic bacteria, and other types of microorganisms.
36 These mats are good models to study biogeochemical processes, such as chemical
37 elements cycles, in which a variety of microorganisms cooperate and interact in
38 complex ways. They are often found under extreme conditions and their study
39 contributes to our understanding of extremophilic life (Seckbach & Oren, 2009).

40 Recent studies on microbial mats communities from chemosynthesis-based
41 ecosystems such as cold seeps areas (Arakawa, *et al.*, 2006, Gilhooly, *et al.*, 2007),
42 mud-volcanoes (Heijs, *et al.*, 2005, Omoregie, *et al.*, 2008) or sulfide-rich caves
43 (Engel, *et al.*, 2004, Dattagupta, *et al.*, 2009) have shown they may host a great
44 bacterial diversity dominated by *Proteobacteria*, including filamentous species
45 belonging to the order *Thiotrichales*.

46 White filamentous mats have also been observed in various oceanic hydrothermal
47 vents fields; large bacteria, morphologically affiliated to *Beggiatoa* and *Thiothrix*
48 genera, were the dominant morphotypes (Jannasch & Wirsen, 1981, Jacq, *et al.*,
49 1989, Jannasch, *et al.*, 1989, Nelson, *et al.*, 1989, Kalanetra, *et al.*, 2004). These
50 organisms, members of the order *Thiotrichales* (*Gammaproteobacteria*), are known
51 for their ability to form biofilms on oxic/anoxic interfaces, using dissolved free oxygen
52 to oxidize reduced sulfur compounds (Teske & Nelson, 2006).

53 Despite this fact, only a few studies, carried out along Mariana Arc (Davis & Moyer,
54 2008) at Loihi Seamount (Hawaii) (Moyer, *et al.*, 1995), 17°S EPR hydrothermal vent
55 field (Longnecker & Reysenbach, 2001), Lost City vent fields (MAR) (Gerasimchuk, *et*
56 *al.*, 2010), Fryer and Kaiko hydrothermal areas (South of the Mariana Trench) (Kato,
57 *et al.*, 2009), attempted to characterize the microbial communities of deep-sea

58 hydrothermal vent mats. Here, microbial mats were sampled from the Tour Eiffel
59 edifice located on the Lucky Strike (LS) hydrothermal vent field on the Mid-Atlantic
60 Ridge (MAR) (37, 29°N; 32, 28°W) (37, 29°N; 32, 28° W) (Lee Van Dover, *et al.*,
61 1996, Sarradin, *et al.*, 1999). The LS spreads around a central lava lake and where
62 both high temperature active black smokers (324°C) and lower temperature diffuse
63 flow areas (170°C) are observed. The Eiffel Tower is a 12 m high sulfide central
64 structure located at 1650-1700 m depth. On this site, a large part of fluid-exposed
65 hydrothermal deposits and *Bathymodiolus azoricus* mussels assemblages are
66 covered by white filamentous mats whose role are still not understood. These
67 mussels dominate the megafauna and form large assemblages in low temperature
68 flow areas around the central edifice (De Busserolles, *et al.*, 2009). Although the
69 environment around mussels communities is subjected to temporal variations, it is
70 characterized by a pH of 5.9 to 7.3 plus sulfides and methane concentrations
71 permitting chemosynthetic activity (De Busserolles, *et al.*, 2009, Cuvelier, *et al.*, in
72 press).

73 *B. azoricus* mussels harbor, within its gills, both thiotrophic and methanotrophic
74 symbionts (Duperron, *et al.*, 2006). The two species *B. azoricus* and *B.*
75 *puteoserpentis*, found on the Northern MAR (Menez Gwen, Lucky Strike, Rainbow,
76 and Logatchev) share the same two dominant bacterial symbiont phylotypes which
77 belong to the *Gammaproteobacteria* (Duperron, *et al.*, 2006). These chemosynthetic
78 microorganisms enable the host to colonize sulfide and/or methane rich
79 environments. The acquisition pathways of symbionts are not yet fully understood,
80 although some studies support the environmental transmission of thiotrophic
81 symbionts (Won, *et al.*, 2003). Up to now, no free living symbiont has ever been
82 described in this environment.

83 16S rDNA-based phylogeny complemented by functional genes analyses permit a
84 better understanding of microbial contribution in chemosynthetic ecosystems (Elsaied
85 & Naganuma, 2001). According to the LS fluids chemical composition, we have
86 focused our study on the main chemoautotrophic metabolisms that may occur within
87 the mat microbial communities: sulfite oxidase gene (*soxB*), iron-sulfur flavo-protein
88 adenosine-5-phosphosulfate reductase (*aprA*) and the particulate methane
89 monooxygenase (*pmoA*) are key genes encoding proteins involved in sulfur and
90 methane oxidation, respectively. *SoxB*, a gene of the multi-enzyme thiosulfate-

91 oxidizing complex, and *aprA* constitute efficient functional markers for the two major
92 biochemical pathways of bacterial sulfur oxidation. Adenosine 5'-Phosphosulfate
93 (APS) reductase is used in both the reductive and oxidative modes of sulfur
94 pathways and is therefore found in both sulfate reducers and sulfur oxidizers. In
95 sulfate reducers APS reductase catalyzes the two-electron reduction of APS to sulfite
96 and to adenosine monophosphate AMP, and in sulfur oxidizers, it catalyzes the
97 reverse reaction. APS reductase is a multi domain protein comprising an alpha and
98 beta subunit, encoded by *aprA* and *aprB* genes, respectively. The *aprA* gene has
99 been proposed as a useful phylogenetic marker for bacteria involved in oxidative and
100 reductive sulfur pathway (Meyer & Kuever, 2007, Meyer & Kuever, 2007). Particulate
101 membrane form of the methane monooxygenase (pMMO) has been reported in all
102 methanotrophs except the genus *Methylocella* (Dedysh, *et al.*, 2000). As the *pmoA*
103 gene phylogeny is congruent with the 16S rRNA phylogeny (Bourne, *et al.*, 2001), it
104 is used to study methane oxidizer diversity, rather than the soluble cytoplasmic form
105 (sMMO) which is present only in some methanotrophic strains (Fuse, *et al.*, 1998,
106 Shigematsu, *et al.*, 1999). Carbon metabolic pathways can be described using
107 domain-specific primers of genes encoding enzymes involved in the Calvin-Benson-
108 Basham (CBB) or in the reductive tricarboxylic acid (rTCA) cycles, the two main
109 pathways for carbon dioxide assimilation: d-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-
110 oxygenase RuBisCO genes form 1 (*cbbL*) and 2 (*cbbM*) and ATP-dependent citrate
111 lyase sub-unit B (*acIB*). *CbbL/M* are usual markers of RuBisCO Forms I and II,
112 enzymes which are directly involved in the CBB cycle and have a well-recognized
113 autotrophic CO₂-fixing function which supports growth (Badger & Bek, 2008)(De
114 Burgh *et al.*, 1989); *acIB* is a key enzyme of the rTCA cycle, which seems to be used
115 in a variety of deep-sea *Epsilonproteobacteria* (Campbell & Cary, 2004, Takai, *et al.*,
116 2005).

117 To better understand microbial mats function in the LS ecosystem and their possible
118 relationships with other biological communities, we have characterized those using
119 molecular approaches. For this purpose, both DNA and RNA from mats samples
120 covering hydrothermal deposits or *B. azoricus* faunal assemblages were extracted.
121 Universal primers were used to amplify 16S ribosomal RNA gene from both DNA and
122 RNA extracts, as well as functional genes implicated in sulfur, methane and carbon

123 pathways. Moreover, *Bathymodiolus* sp. symbionts specific primers were used to
124 look for free-living symbiont like phylotypes.

125 **Material and methods**

126 *Sampling site and procedure*

127 The LS vent field (1700 m depth) is located at 31°17'N, 32°16'W on the MAR.
128 Microbial mats filaments covering *B. azoricus* assemblages and hydrothermal
129 deposits were sampled on the East and South sides of the Tour Eiffel edifice during
130 the French cruises EXOMAR (2005), MoMARETO (2006) and MoMAR-08 (2008).
131 Mat samples were retrieved on mussels assemblages 1 and 2b and Substratum 1b
132 as defined by Cuvelier (Table 4 supplementary data) (Cuvelier, *et al.*, 2009). They
133 were collected using the water pumping device of the ROV "Victor 6000" into 5 L
134 pouches or by scraping of mussel shells brought to the surface into beforehand
135 decontaminated boxes. Before dive the water pumping device tubes was washed
136 twice with Desibac HPS™ (7 d'Armor), rinsed with sterile water, then with alcohol and
137 finally filled with sterile sea water. Once on board, the content of the pouches were
138 filtered with 0.2 µm pore size filters. Both type of samples (filters and mat scraping)
139 were transferred into sterile 2 mL Nunc Cryotubes™ filled with sterile seawater or
140 RNA*later*™ and immediately frozen at - 80°C.

141 *DNA extraction and PCR amplification*

142 Total DNA was extracted using FastDNA® Spin kit for soil (Qbiogene, Inc, CA)
143 protocol as modified by Webster and Roussel (Webster, *et al.*, 2003, Roussel, *et al.*,
144 2009).

145 For the phylogenetic analyses, amplifications of 16S rRNA genes were performed
146 using the universal primers for *Bacteria* and *Archaea*: U1492R as reverse primer and
147 E8f for *Bacteria* or A8f for *Archaea* as forward primer (all primers used for the study
148 are summed in Table 5 supplementary data). Presence of sulfo-oxidizers was
149 investigated with two couples of primers: APS1F/APS4R and Sox432F/Sox1446R,

150 specific of adenosine 5'phospho-sulfate reductase α -sub-unit gene and *soxB* genes
151 respectively. To study methane oxidation A189F/MB661R primers were used,
152 specific of particulate methane monooxygenase gene. For autotrophic carbon fixation
153 we amplified forms 1 and 2 of RuBISCO with respectively *cbbLF/cbbLR* and
154 *cbbMF/cbbMR/cbbMR* primer combinations, plus ATP-citrate lyase β sub-unit gene
155 with *aclB892F/aclBR* primers.

156 The bulk DNA was amplified in a 25 μ L reaction mix containing: 5 μ L of 5X GoTaq®
157 Flexi DNA polymerase buffer (Promega), 1.5 μ L of 25 mM MgCl₂ solution, 0.2 μ L of
158 10mM dNTPs solution, 0.1 μ L of each primer at 100 pM and 0.12 μ L of 5U. μ L⁻¹
159 GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega). Domain-specifics *Bathymodiolus* sp.
160 symbionts 16S rRNA gene primers (Boutet, in press) based on specific FISH probes
161 (Duperron, *et al.*, 2007) were tested. For methanotrophic symbionts Meth138F and
162 Meth845R (5'- GCT-CCG-CCA-CTA-AGC-CTA-TAA-ATA-GAC-C-3') as reverse
163 primer were used. For thiotrophic symbionts, Sulfo195F and Sulfo642R as reverse
164 primer were used.

165 PCR conditions were the same as indicated in reference publications for each couple
166 of primers.

167 *RNA extraction and RT-PCR amplification*

168 Total RNA was extracted using the FastRNA® Pro soil direct kit (Qbiogene, Inc, CA)
169 according to the manufacturer's instructions. To digest trace amounts of DNA, the
170 extraction products were incubated 1 h at 37°C with 1X TURBO DNase® buffer and
171 18U of TURBO DNase® (Ambion™). The digestion was stopped by adding EDTA to
172 a final concentration of 15 mM and heating 10 min at 65°C before a purification step
173 with the RNeasy minikit (Qiagen™) following the manufacturer's instructions. The
174 absence of DNA was tested by direct PCR which were all negative.

175 RNA reverse transcriptions, followed by DNA amplification, were performed using the
176 OneStep RT-PCR kit (Qiagen™). Amplifications were performed using the same
177 primers set as for PCR amplification except to amplify 16S rRNA gene: 907R with
178 E8f for *Bacteria* and 915R with A8F for *Archaea* were used (Table 5 supplementary
179 data).

180 PCR conditions were the same as indicated in reference publications for each couple
181 of primers but we added a reverse-transcription step (30 min at 50°C) and an initial
182 PCR activation step at 95°C for 15 min before the standard cycles.

183 *Clone library construction and sequencing*

184 Before cloning, all PCR products were purified using the Qiaquick® Gel Extraction Kit
185 (Quiagen) according to the manufacturer's instructions. Clone libraries were
186 constructed by transforming *E. coli* TOP10F' using the TOPO XL Cloning kit
187 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Plasmid extraction,
188 purification and sequencing were carried out by the sequencing OUEST-Genopole
189 Plateform® of Roscoff Marine laboratory (France).

190 *Phylogenetic analysis*

191 Sequences alignment, edition and analysis were performed using both BioEdit 7.0.9
192 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) and MUSCLE (Edgar, 2004)
193 softwares. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene sequences were done using
194 PHYLO_WIN (Galtier, *et al.*, 1996) with the neighbour-joining algorithm with Kimura 2
195 correction. Phylogenetic analyses of the other gene sequences were done with
196 amino-acid deduced sequences with the same software and algorithm, but with PAM
197 correction. Robustness was tested by bootstrap re-sampling (1,000). Sequences
198 displaying more than 97% similarity were clustered within the same OTU. Rarefaction
199 curves at 97% sequences similarity levels were performed using the DOTUR
200 program (Schloss & Handelsman, 2005).

201 *Nucleotide sequence accession numbers*

202 For each OTU, one sequence was deposited in the GenBank database under
203 accession numbers FR670348 to FR670522 for 16S rRNA gene sequences and
204 FR670535 to FR670580 for functional gene sequences.

205 **Results**

206 *Macroscopic and microscopic description*

207 Lucky Strike's microbial mats appeared as white attached filaments covering a large
208 part of the mussel assemblages and fluid exposed hydrothermal deposits (Fig. 1).
209 Light microscopy observations revealed a wide diversity of morphologies both in
210 shape and size among microbial populations. Different kinds of filaments looking like
211 White Point filamentous bacterial populations were observed (Jacq, *et al.*, 1989,
212 Kalanetra, *et al.*, 2004) in addition to numerous coccoid- and rod-shaped organisms.
213 Large vacuolated filaments (14 μm to 65 μm in diameter), containing inclusions that
214 could be sulfur granules, were the dominant morphotype among the mats
215 communities, but thinner filaments (2 μm to 6 μm in diameter), probably non-
216 vacuolate, and rosettes or tangle of smaller filaments were also observed (Fig. 1).

217 *Archaeal and bacterial diversity in LS hydrothermal microbial mats*

218 Sixty-one archaeal related sequences were retrieved from the 16S rRNA gene
219 library. They were distributed in only four OTUs defined at 97% of similarity threshold.
220 The archaeal 16S RNA transcript library was even less diversified, with only one OTU
221 clustering the 22 sequences.

222 Three hundred twenty-three bacterial related sequences were retrieved from the
223 bacterial 16S rRNA gene library. They were distributed in 163 OTUs defined at 97%
224 of similarity threshold (Table 1). Bacterial RNA transcript library was less diversified
225 with the 76 sequences distributed in only three OTUs.

226 Estimation of diversity and representativeness of the microbial communities was
227 performed using rarefaction curves, diversity and coverage indices (Table 1 and Fig.
228 4 supplementary data). Coverage rates were high and curves reached saturation for
229 archaeal related clone sequences obtained both from 16S rRNA gene and transcript
230 libraries and also for the bacterial RNA transcript library. In contrast, for the bacterial
231 16S rRNA gene library, the coverage rate was only 55% and curves did not reach
232 saturation, indicating that the molecular analysis only retrieved the dominant phyla.

233 Simpson indices confirmed that the bacterial diversity was high, even if the active
234 part of this community seemed limited to a few species.

235 *Archaeal community structure*

236 The archaeal diversity, according to the 16S RNA gene sequences retrieved, was
237 restricted to *Thaumarchaeota* Marine Group I. Among this phylum, almost all
238 sequences were closely related (99 % similarity) to the *Nitrosopumilus maritimus* 16S
239 rRNA gene sequence and also, but more distantly (97 % similarity), to species
240 *Candidatus Giganthauma karukerense* and *Candidatus Giganthauma insulaporcus*
241 (Fig. 5 supplementary data). The same sequence related to *Nitrosopumilus maritimus*
242 was also the only OTU identified in the 16S RNA transcript library.

243 *Bacterial community structure*

244 The 323 bacterial 16S rRNA gene sequences analysis showed a phylogenetically
245 diverse bacterial population in the mats (Table 3 and Fig. 6-7 supplementary data).
246 Bacterial retrieved sequences were affiliated to seven phyla but among them,
247 *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* phylum were clearly dominant. Within
248 *Proteobacteria*, various OTUs were related to genera implied in sulfur oxidation like
249 *Roseobacter*, *Sulfitobacter* and *Thalassobacter* for the *Alphaproteobacteria*,
250 *Beggiatoa* and *Leucothrix* for the *Gammaproteobacteria*, *Sulfurimonas* and
251 *Sulfovorum* for the *Epsilonproteobacteria*. A few *Gammaproteobacteria* sequences
252 related to the methane metabolic pathways were also retrieved with affiliations to
253 *Methylobacter* and *Methylomonas* genera (Costello & Lidstrom, 1999, Hirayama, *et*
254 *al.*, 2007); moreover two sequences were closely affiliated (99.7 % similarity) to the
255 *B. azoricus* methanotrophic symbiont (Duperron, *et al.*, 2006). The main part of
256 observed OTUs was affiliated to clones from various chemosynthetic ecosystems
257 including hydrothermal fauna associated clones and microbial mats from: Milano mud
258 volcano (Heijs, *et al.*, 2005), Japan sea cold-seeps (Arakawa, *et al.*, 2006), White
259 Point shallow hydrothermal area (Kalanetra, *et al.*, 2004), Okinawa and Lost City vent
260 fields (Hirayama, *et al.*, 2007, Brazelton, *et al.*, 2010).

261 The 16S RNA transcript library analysis showed a bacterial active community
262 restricted to three OTUs. Almost all sequences were closely affiliated (99% similarity)
263 to the 16S rRNA gene sequence of a White Point filamentous *Beggiatoa* also
264 retrieved in direct PCR (Table 2 and Fig. 6 supplementary data). This vacuolated,
265 filamentous, sulfur-oxidizing bacterium was described as attached to diverse biotic
266 and abiotic substrates at shallow hydrothermal vents near White Point, California
267 (Kalanetra, *et al.*, 2004). The two others sequences were affiliated respectively to an
268 uncultivated *Gammaproteobacteria* from Lost City vent field (Brazelton, *et al.*, 2006)
269 and to an *Alphaproteobacteria* from the EPR (Santelli, *et al.*, 2008).

270 *Presence of Bathymodiolus symbionts 16S DNA and RNA*

271 Two sequences from our 16S DNA library were closely affiliated (>99% similarity) to
272 the monophyletic methanotrophic *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* symbiont
273 (*Gammaproteobacteria*) from the MAR, but none were affiliated to the thiotrophic
274 symbiont. To confirm this result and investigate the presence of a free-living mussel
275 symbiont, we have used new designed domain-specific *Bathymodiolus* sp.
276 methanotroph or thiotroph symbionts 16S ribosomal RNA primers (Boutet, in press).

277 Eleven 16S DNA clone sequences and ten RNA clone sequences were retrieved with
278 the meth138F/845R couple of primers, designed for methanotrophic symbionts. All
279 sequences were identical to each and closely matched (>99% similarity) with the
280 monophyletic methanotrophic *B. azoricus* and *B. puteoserpentis* symbiont sequence
281 from MAR (Duperron, *et al.*, 2006) (Fig. 2 A).

282 Twelve 16S DNA clone sequences and ten RNA clone sequences were retrieved
283 with the sulfo193F/642R primers set designed for thiotrophic symbionts. Three OTUs
284 were detected in both gene DNA and RNA transcript sequences; two of them were
285 related (93.7 and 100% similarity) to *B. azoricus* thioautotrophic symbionts from LS
286 (Duperron, *et al.*, 2006, Won, *et al.*, 2008) (Fig. 2 A).

288 Six DNA and four RNA transcript clone libraries targeting functional genes were
289 done. While we failed to obtain gene fragments using Sox432F/Sox1446R and *acIB*
290 892 F/*acIB* R couples of primers in RT-PCR, successful PCR amplifications indicated
291 at least the presence of microorganisms having *soxB* and *acIB* genes in the
292 community.

293 **Sulfur oxidation.** Forty clones from DNA library and sixteen clones from RNA library
294 were retrieved using *Adenosine-5'*-phosphosulfate (*aprA*) primers (Fig. 3 C). Clone
295 sequences were distributed between SOB *apr* lineage 1 and 2, and were all affiliated
296 to sequences related to *Gammaproteobacteria*. Most of both transcript and gene
297 sequences were related to a *Siboglinidae* tubeworm symbiont from the eastern
298 Mediterranean cold seeps (Duperron, unpublished). Also, one transcript sequence
299 related to a bacterial endosymbiont of the bivalve *Idas* sp. (Duperron, *et al.*, 2008)
300 was identified. Within the gene sequences, some were related to clones associated
301 with symbionts of tubeworms like *Sclerolinum contortum* and *Oligobrachia*
302 *haakonmosbiensis* from Håkon Mosby mud volcano (Lösekann, *et al.*, 2008) and
303 others with symbiont of species like *Asterechinus elegans*, an *Echinodermata*
304 associated with wood-falls (Becker, *et al.*, 2009) and *Kiwa hirsuta*, a galatheid
305 collected from hydrothermal vents in the Pacific-Antarctic Ridge (Goffredi, *et al.*,
306 2008).

307 Thirty-one gene clones were retrieved using *soxB* primers but no transcript was ever
308 amplified (Fig. 3 A). All the retrieved sequences were far related from known species
309 but were related to α and *Gammaproteobacteria* sulfo-oxidizers (Mukhopadhyaya, *et*
310 *al.*, 2000, Meyer, *et al.*, 2007).

311 **Methane oxidation.** Thirty-three particulate methane mono-oxygenase (*pmoA*) gene
312 and fifteen transcript sequences were retrieved using *pmoA* primers (Fig. 2 B). This
313 transcript library confirmed the presence of active methane oxidizers, all affiliated to
314 *Gammaproteobacteria* in the microbial mat community. They were related to
315 uncultured bacteria from Pacific Northwest marine sediments (Nold, *et al.*, 2000) or
316 Rainbow vent field (MAR) (Nercessian, *et al.*, 2005) and to *Bathymodiolus childressi*
317 symbionts (Duperron, *et al.*, 2007). In addition, sequences related to *B. azoricus*
318 symbionts, to the *Methylococcales* *Methylohalobius crimeensis* (Heyer, *et al.*, 2005),

319 to *Idas* sp. symbiont (Duperron, *et al.*, 2008) and to uncultured bacteria from methane
320 seeps habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc (Inagaki, *et al.*, 2004)
321 were retrieved in the *pmoA* gene library.

322 **Carbon fixation.** Fifty-four RuBisCO form 1 (*cbbL*) gene and twelve transcript
323 sequences, all related to *Gammaproteobacteria*, were retrieved (Fig. 3 B). Several
324 clones, from both libraries, were affiliated to a *Lucinoma aff. kazani* endosymbiont
325 (Duperron, *et al.*, 2007) and *Solemya velum* gill sulfur-oxidizing symbionts
326 (Schwedock, *et al.*, 2004). In the gene library, sequences distantly affiliated to the
327 *Chromatiales Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 and *Halothiobacillus neapolitanus*
328 (Baker, *et al.*, 1998) were also identified.

329 Thirty-eight RuBisCO form 2 (*cbbM*) gene and twelve transcript sequences were
330 retrieved (Fig. 3 C). Most of them are related to *Gammaproteobacteria*. Sequences
331 related to a *Thiobacillus* sp. *Lamellibrachia* symbiont (Elsaied & Naganuma, 2001)
332 and to a Vestimentiferan tubeworm symbiont (Vrijenhoek, *et al.*, 2007) were identified
333 in both genes and transcript libraries. In the gene library, sequences related to
334 tubeworms symbionts of *Lamellibrachia* from Håkon Mosby mud volcano (Lösekann,
335 *et al.*, 2008) and to the *Epsilonproteobacteria Ridgeia piscesae* were also retrieved.
336 Additionally sequences related to the nitrogen fixing *Alphaproteobacteria*
337 *Rhodobacter capsulatus* (Larimer, *et al.*, 1995) were identified, as well as sequences
338 related to organisms from diverse marine environments.

339 Twenty-eight ATP-citrate lyase B gene sequences were obtained using *acIB* primers
340 but we failed to construct a transcript library (Fig. 3 D). All the *acIB* gene sequences
341 were affiliated to *Epsilonproteobacteria*, including *Sulfurimonas* and *Arcobacter*
342 genera relatives (Campbell, *et al.*, 2003, Takai, *et al.*, 2005) and hydrothermal
343 invertebrates epibionts associated with *Kiwa hirsuta* (Goffredi, *et al.*, 2008) and
344 *Alvinella pompejana* (Campbell, *et al.*, 2003).

345 **Discussion**

346 *Limits of the molecular approaches*

347 Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences from the LS microbial mats
348 revealed the presence of a highly diversified bacterial community while the detected
349 archaeal diversity was rather limited. Because of the low Good's coverage level
350 (55.1%, Table 1) for the bacterial 16S rRNA gene sequence library, and because of
351 biases associated with PCR, DNA/RNA extraction and cloning (Wintzingerode, *et al.*,
352 1997), the abundance of a particular OTU in a library does not necessarily reflect its
353 real abundance in the original sample (Teske & Sorensen, 2008). Environmental
354 free-living micro-organisms not directly involved in mats structure and activity may
355 also have been trapped in the mat and so giving an incorrect microbial diversity
356 image.

357 In addition our results underline the need of specific primers use to amplify 16S rRNA
358 gene of low represented species or specific groups, which are not retrieved with
359 universal primers. For example, we noted that even if we have identified some
360 *Planctomycetes* related sequences, none of them were affiliated with anammox
361 (anaerobic ammonium oxidation) clones already retrieved from the same mat
362 samples analyzed in a previous study (Byrne, *et al.*, 2008). In this study the use of
363 specific primers also reveal the thiotrophic symbiont 16S signatures while universal
364 16S rRNA gene primers failed to detect them.

365 Messenger RNA, encoding for functional genes, have a short intracellular lifetime and
366 so represent a direct link to the active metabolic processes. This make them more
367 suitable as microbial activity indicators than 16S rRNA molecules, which can persist a
368 few days in the environment (Chin, *et al.*, 2008, Lloyd, *et al.*, 2010). In this study both
369 approaches have been combined.

370 Finally, it should be noted that the phylogenetic assignation and role of bacterial
371 communities were difficult to obtain due to the presence of numerous bacterial 16S
372 rRNA sequences that were less than 94% similar to their closest cultured relatives.
373 Most of them might then represent undiscovered new genera or families. Conferring
374 a possible phenotype to the organisms detected in this study must therefore be done
375 with caution. This is particularly crucial for the phylogenetic groups that contain

376 phenotypically diverse organisms, such as the *Proteobacteria*. For the functional
377 gene libraries analysis, the situation is even more complicated due to the lack of data
378 and to the overrepresentation of symbiont related sequences in the gene banks.

379 *Prevalence of sulfur oxidizers among microbial populations*

380 Quite low but constant level of sulfides surrounding the mat samples (0.8-2 μM) and
381 the presence of oxygen (230-240 μM) (Sarradin, *et al.*, 2009, Cuvelier, *et al.*, in
382 press) make the mats a good habitat for sulfo-oxidizers populations. The highest
383 number of clone sequences retrieved in our 16S rRNA bacterial library (Table 3) was
384 affiliated to the *Gammaproteobacteria*: most of them were closely related to
385 environmental sequences retrieved from deep-sea sediments and some clustered
386 within groups containing sulfur/methane-oxidizing isolates and gill symbionts.
387 Functional gene libraries have also shown the preeminence of clone sequences
388 affiliated to similar populations: the nine OTUs detected with the *aprA* gene-based
389 analysis all belonged to the *Gammaproteobacteria* symbiotic cluster (Meyer and
390 Kuever 2007) (Fig. 2 C). In the same way, within the eight OTUs detected with the
391 *soxB* gene, three are related to *Gammaproteobacteria* sulfo-oxidizers (Fig. 3 A). In
392 addition, form 1 and 2 RuBisCO gene sequences confirmed the presence of
393 chemoautotrophs belonging to this group (Fig. 3 B, C).

394 However, despite this high taxonomic diversity, 16S rRNA transcript library was
395 dominated by sequences affiliated to a filamentous *Beggiatoa*. This could indicate the
396 dominance of this genus among active microbial communities, but our failure to build
397 a *soxB* gene transcript library did not permit us to conclude about *Beggiatoa* sulfo-
398 oxidizing activity. This pathway might also be present but not active at the sampling
399 time or that this messenger is more sensitive than others, having a more rapid turn-
400 over leading to its degradation during the samples recovery. On the contrary, the use
401 of *aprA* gene primers permitted us, through transcript library analysis, to detect three
402 OTUs belonging to the *Gammaproteobacteria* symbiotic cluster and doing active
403 sulfo-oxidation (Fig. 2 C). Form 1 and 2 RuBisCO gene transcript libraries have also
404 shown active carbon fixation for three OTUs related to *Gammaproteobacteria*
405 potential symbionts (Fig. 3 B, C). No transcript belonging to *B. azoricus* thiotroph
406 symbionts were found in functional gene *aprA* library despite its presence in both 16S

407 rRNA libraries (RNA and DNA) built with symbiont specific primers. A low symbiont
408 cell concentration in the sample or no sulfo-oxidizing activity at the time of sampling
409 could explain this. The symbionts could be in a dormant form before being trapped
410 within the gill cells of the *Bathymodiolus* sp.

411 Oxidation of reduced sulfur compounds as a possible prevailing microbial metabolism
412 among the mats was also consistent with the finding of sequences clustering among
413 the epsilon- and *Alphaproteobacteria* and the *Bacteroidetes* group in the 16S rRNA
414 library (Table 3, Fig. 6- 7 supplementary data). Several recent molecular studies have
415 shown the presence and the dominance of the *Epsilonproteobacteria* as both free-
416 living organisms or in association with metazoans at deep-sea hydrothermal vents
417 (Corre, *et al.*, 2001, Campbell, *et al.*, 2006, Zbinden, *et al.*, 2008). In this study, lot of
418 sequences from 16S rRNA library were affiliated to the *Epsilonproteobacteria*
419 *Helicobacteraceae* family and group F, which include OTUs of vent epibionts and
420 environmental sequences from deep-sea cold seeps and hydrothermal vents (Corre,
421 *et al.*, 2001). The phylogenetic analysis of the key rTCA gene and form 2 RuBisCO
422 gene libraries have also revealed OTUs related to known *Epsilonproteobacteria*.
423 Surprisingly, neither sequence among the *aprA* nor *soxB* clone libraries matched
424 within the *Epsilonproteobacteria* known sequences, which were well represented in
425 both 16S and *acIB* gene libraries. This might indicate PCR biases or predominance of
426 *Gammaproteobacteria* in sulfo-oxidizer populations. The *Epsilonproteobacteria* are
427 known for their metabolic and thermal versatility, using a variety of electron donors
428 and acceptors. Hydrothermal vent diffuse flow sites, which are areas of mixing
429 between hydrothermal fluids and ambient seawater, provide an ideal habitat for
430 members of this subdivision (Inagaki, *et al.*, 2004, Campbell, *et al.*, 2006, Takai, *et*
431 *al.*, 2006).

432 The *Alphaproteobacteria* and the *Bacteroidetes* groups are ubiquitous in diverse
433 marine environments, including surface and deep waters, sediments (Lopez-Garcia,
434 *et al.*, 2001, Kirchman, 2002), and deep-sea hydrothermal vents (Reysenbach, *et al.*,
435 2000, Alain, *et al.*, 2002, Lopez-Garcia, *et al.*, 2002, Huber, *et al.*, 2003). Presence of
436 sequences belonging *Alphaproteobacteria* in 16S rRNA library as well as in *soxB* and
437 RuBisCO form 2 gene libraries (Fig. 3 A and C) seemed to show its importance in LS
438 mats, even if no transcript sequence were obtained. The *Bacteroidetes* bacteria are
439 usually aerobic chemoorganotrophic or lithotrophic microorganisms and exhibit

440 diverse metabolic capabilities (Kirchman, 2002, Edwards, *et al.*, 2003) like oxidation
441 of reduced sulfur compounds, although they do not depend on this reaction for
442 growth (Teske, *et al.*, 2000).

443 *Presence of active methane oxidizers*

444 Methane concentrations in LS smoker were 0.68 mM and 0.5 to 40 μ M in the mussel
445 assemblages (Table 4 supplementary data). These values make possible the
446 methane metabolic pathway among our mat samples.

447 Few sequences in the 16S rRNA gene library were affiliated to the *Methylobacterales*
448 and *Methylococcales* orders (γ -*Proteobacteria*) (Fig. 6 supplementary data). In
449 addition, the presence in the 16S rRNA transcript library of one sequence related to a
450 methanotrophic uncultured clone could reflect methane-oxidizing activity. The *pmoA*
451 gene-based libraries analysis confirmed this, allowing the detection of eight OTUs,
452 including three in RNA transcript library (Fig. 2 B). This indicated potential active
453 methane oxidizers in our mats such as *Gammaproteobacteria* including
454 *Methylococcales*. It also confirmed the presence (but not the activity) of the
455 methanotrophic *B. azoricus* symbionts among the mat microbial community. As for
456 the thiotroph symbiont, this may indicate that the symbiont-like microorganisms are
457 not active in their free living state and may be in a dormant form.

458 *Others metabolic pathways in LS mats*

459 Apart from methane and sulfur oxidizers, geochemistry of the vent fluids at LS
460 provide favorable conditions for others chemoautotrophic metabolisms based on the
461 use of ammonium, hydrogen, metals, etc (Salerno, *et al.*, 2005, Duperron, *et al.*,
462 2007, Sarradin, *et al.*, 2009). Our study didn't focus on these pathways but 16S rRNA
463 libraries analysis gave us some pieces of information. *Nitrosopumilus maritimus*
464 related specie was the dominant archaeal species in both gene and transcript
465 archaeal 16S rRNA libraries and constituted probably the main present and active
466 *Archaea* within the collected mats (Fig. 5, supplementary data). This ubiquist and
467 low-temperature *Thaumarchaeota* grows chemolithoautotrophically by the aerobic

468 oxidation of ammonium to nitrite (Konneke, *et al.*, 2005). Its presence in LS microbial
469 mats could reflect the presence of aerobic ammonium oxidizing activity, which is
470 consistent with ammonia rates in the LS hydrothermal fluid (8-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and in the
471 mussel bed environment ($< 2 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Sarradin, *et al.*, 1999). Nevertheless, the
472 recent discovery of giant *Thaumarchaeota* species, with 16S rRNA gene sequence
473 close to *Nitrosopumilus maritimus* one but completely different in terms of
474 morphology and metabolism (Muller, *et al.*, 2010) makes any assumption fragile.

475 Heterotrophs also seemed very present with an important number of OTUs affiliated
476 to the *Bacteroidetes* phylum in the 16S rRNA gene library (Table 3 and Fig. 7
477 supplementary data). Their ability to degrade diverse organic molecules also explains
478 the diversity of this group in rich organic material systems like mats (Kirchman, 2002,
479 Stevens, *et al.*, 2005).

480 Other sequences in this library were related to members of the *Deltaproteobacteria*
481 with species affiliated to *Myxococcales* and *Desulfurobacterales* (Table 3 and Fig. 6,
482 supplementary data). The *Myxococcales* contain various aerobic heterotrophs and
483 the *Desulfurobacterales* have been described as being able to reduce sulfate
484 (Rabus, *et al.*, 2006). However, despite the fact that APS reductase is used in both
485 the reductive and oxidative pathways of sulfur metabolisms, we did not identify any
486 sequence affiliated to sulfate-reducers (Fig. 2 C). The existence in mats of anaerobic
487 microenvironments where sulfate-reducers could be active cannot nevertheless be
488 rejected. This phenomenon could be consistent with the diversity of RuBisCO form 2
489 gene library while this form is only functional in anaerobic conditions (Haygood, 1996,
490 Elsaied, *et al.*, 2007). Biases in PCR and the ability of mats to aggregate
491 environmental free living micro-organisms, some of them being anaerobic, might also
492 partially explain these results.

493 *Identification of the filamentous bacteria and possible interactions with mussels*

494 While our data demonstrated the existence of a highly diverse microbial community
495 within microbial mats, all together light micrograph observations (Fig. 1) and
496 molecular results indicated the dominance of a large filamentous phylotype probably
497 involved in sulfur cycle. The 16S rRNA gene transcript sequences were affiliated to

498 those of a large marine, sulfur-oxidizing *Beggiatoa* species (*Thiotrichales* order of the
499 *Gammaproteobacteria*) isolated in the White Point California shallow hydrothermal
500 system, confirming the morphological observations (Jacq, *et al.*, 1989, Kalanetra, *et*
501 *al.*, 2004). While these sequences dominated our RNA transcript library, they were
502 only present in a few copy in our gene library, suggesting possible biases in lysis
503 efficiency, a low 16S rRNA genes copy number, PCR amplification troubles and other
504 factors already mentioned in literature (Heijs, *et al.*, 2005). It is difficult to affiliate the
505 others morphologies observed (2-6 μm in diameter or smaller filaments) with clone
506 sequences, but preliminary FISH (Fig. 8, supplementary data) results showed they
507 mostly belonged to *Gammaproteobacteria*. In addition, the presence of one clone
508 closely affiliated (99%) to an uncultured *Leucothrix sp.* in our 16S rRNA gene library
509 suggested at least another member of the *Thiotrichales* might be present (Fig. 6,
510 supplementary data).

511 The relationships between mussels and mats are still poorly understood and studied
512 but, with the results obtained here, we can draw some hypotheses. It was previously
513 demonstrated that dense clusters of *B. thermophilus* can disperse laterally the
514 hydrothermal fluids for distances of several meters. This dispersion increase the
515 redox transition zone area, where both dissolved oxygen and hydrogen sulfide are
516 available. As a result, faunal communities can occupy areas that would not otherwise
517 provide adequate reduced substrates (Johnson, *et al.*, 1994). Large filamentous
518 bacteria composing mats could benefit from this extended redox transition zone for
519 growth. The profit does not seem mutual since poor bacterial population were
520 observed in *B. azoricus* digestive track (Crépeau, unpublished results), suggesting a
521 low bacterial consumption. Competition for hydrogen sulfide and methane or a
522 detoxication role do not seem, despite metal-binding properties of
523 exopolysaccharides (Loaïc, *et al.*, 1998), convincing either, because of the co-
524 existence on the same site of healthy mussel assemblages covered or not by mats:
525 no significant physiological and toxicological evidence that emphasizes the influence
526 of associated sulfur-oxidizing filamentous bacteria on mussels was demonstrated to
527 date in the LS area (Cuvelier, *et al.*, 2009, Martins, *et al.*, 2009). The existence of a
528 commensal interaction is the most convincing hypothesis: sulfur and methane
529 oxidizers benefit from the mussel fluid dispersion and numerous heterotrophs such
530 as *Bacteroidetes phylum* could degrade the organic material that is released.

531 *An implication of mats in symbiont transmission?*

532 Two sequences among our 16S DNA library and one in our *pmoA* DNA library were
533 affiliated to *B. azoricus* methanotrophic symbionts genes. Moreover the use of
534 domain-specific primers enable us to obtain clone sequences closely affiliated
535 (>99.5%) to both thiotrophic and methanotrophic symbionts of *B. azoricus* (Fig. 2 A
536 and B). In addition, presence of 16S RNA transcript clones indicated, besides the
537 presence of these symbionts, that they might be metabolically active. However, the
538 absence of detected methane or sulfur oxidizers related sequences from *B. azoricus*
539 symbionts through *pmoA* and *aprA* transcript libraries analyses could indicate that
540 even if free-living symbionts are present in the environment, their methane or sulfur
541 oxidation activity only occur inside the mussel bacteriocytes.

542 A possible role of the mats in symbiont transmission process may be postulated.
543 Their structure and localization, in diffuse-flow areas, could offer a favorable
544 environment for upholding and perhaps free-living of both *B. azoricus* symbionts. This
545 is consistent with Van Dover observation that an optimal larval strategy may be a
546 local retention of larvae within environments where symbionts can thrive and
547 contribute to larval and or post-larval infection, and then permit growth (Van Dover, *et*
548 *al.*, 2001). Mats may act as nurseries, helping mussels to keep their symbionts and
549 post-larvae nearby and could then participate to the rapid acquisition of symbionts by
550 post-larvae (Salerno, *et al.*, 2005). It may also help to re-colonise bacteriocytes after
551 a diet period (Kádár, *et al.*, 2005, Riou, 2009) and more generally to the maintenance
552 of mussel assemblages. Hence, our work supports the presumption of environmental
553 acquisition of thiotrophic endosymbionts by vent mussels from the MAR (Won, *et al.*,
554 2003) and may indicate a similar transmission for methanotrophic symbionts.

555 Taken all together our results seemed to tend toward a kind of mutualisms between
556 mats and *Bathymodiolus* patches. The mats may procure a symbiont storeroom for
557 larvae and post larvae infection, and also for larvae settlement. In return the
558 *Bathymodiolus* sp. may furnish organic matter, ammonium and permit fluid diffusion,
559 resulting in a long term association.

560 **Acknowledgements**

561 We thank captain and crew of the R/V *L'Atalante* and *Pourquoi Pas ?*, chiefs
562 scientists and Victor 6000 ROV team during EXOMAR, MoMARETO and MoMAR-08
563 cruises. We gratefully acknowledge Isabelle Boutet to provide us *Bathymodiolus* sp.
564 symbionts 16S rRNA gene primers. We also thank Daniel Prieur and Erwan Roussel
565 for their corrections and advices. This work was done with the financial support of the
566 ANR Deep Oases and the GDR ECCHIS.

567 **References**

- 568 [1] Alain K, Olagnon M, Desbruyeres D, *et al.* (2002) Phylogenetic characterization of the bacterial
569 assemblage associated with mucous. secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella*
570 *palmiformis*. *Fems Microbiology Ecology* **42**: 463-476.
- 571 [2] Arakawa S, Sato T, Sato R, *et al.* (2006) Molecular phylogenetic and chemical analyses of the
572 microbial mats in deep-sea cold seep sediments at the northeastern Japan Sea. *Extremophiles* **10**:
573 311-319.
- 574 [3] Badger M & Bek E (2008) Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in
575 relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *Journal of experimental botany* **59**: 1525.
- 576 [4] Baker SH, Jin S, Aldrich HC, Howard GT & Shively JM (1998) Insertion Mutation of the Form I *cbbL*
577 Gene Encoding Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) in *Thiobacillus neapolitanus*
578 Results in Expression of Form II RuBisCO, Loss of Carboxysomes, and an Increased CO₂ Requirement
579 for Growth. *J. Bacteriol.* **180**: 4133-4139.
- 580 [5] Becker P, Samadil S, Zbinden M, Hoyoux C, Compère P & De Ridder C (2009) First insights into the
581 gut microflora associated with an echinoid from wood falls environments. *Cah. Biol. Mar* **50**: 343-
582 352.
- 583 [6] Blazejak A, Kuever J, Erseus C, Amann R & Dubilier N (2006) Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-
584 bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase genes from
585 gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (*Oligochaeta*) from Bermuda
586 and the Bahamas. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5527-5536.
- 587 [7] Bourne DG, McDonald IR & Murrell JC (2001) Comparison of *pmoA* PCR Primer Sets as Tools for
588 Investigating Methanotroph Diversity in Three Danish Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3802-3809.

- 589 [8] Boutet I (in press).
- 590 [9] Brazelton WJ, Sogin ML & Baross JA (2010) Multiple scales of diversification within natural
591 populations of archaea in hydrothermal chimney biofilms. *Environmental Microbiology Reports* **2**:
592 236-242.
- 593 [10] Brazelton WJ, Schrenk MO, Kelley DS & Baross JA (2006) Methane-and Sulfur-Metabolizing
594 Microbial Communities Dominate the Lost City Hydrothermal Field Ecosystem. *Applied and*
595 *Environmental Microbiology* **72**: 6257-6270.
- 596 [11] Byrne N, Strous M, Cr V, *et al.* (2008) Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing
597 bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *The ISME Journal*.
- 598 [12] Campbell BJ & Cary SC (2004) Abundance of reverse tricarboxylic acid cycle genes in free-living
599 microorganisms at deep-sea hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6282-
600 6289.
- 601 [13] Campbell BJ, Stein JL & Cary SC (2003) Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial
602 community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Applied and*
603 *Environmental Microbiology* **69**: 5070-5078.
- 604 [14] Campbell BJ, Engel AS, Porter ML & Takai K (2006) The versatile epsilon-proteobacteria: key
605 players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 458-468.
- 606 [15] Chin K, Sharma M, Russell L, O'Neill K & Lovley D (2008) Quantifying expression of a dissimilatory
607 (bi) sulfite reductase gene in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Microbial Ecology*
608 **55**: 489-499.
- 609 [16] Corre E, Reysenbach AL & Prieur D (2001) Proteobacterial diversity from a deep-sea
610 hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Letters* **205**: 329-335.
- 611 [17] Costello A & Lidstrom M (1999) Molecular characterization of functional and phylogenetic genes
612 from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Applied and Environmental*
613 *Microbiology* **65**: 5066.
- 614 [18] Cuvelier D, Sarrazin J, Colaço A, *et al.* (2009) Distribution and spatial variation of hydrothermal
615 faunal assemblages at Lucky Strike (Mid-Atlantic Ridge) revealed by high-resolution video image
616 analysis. *Deep-Sea Research Part I* **56**: 2026-2040.
- 617 [19] Cuvelier D, Sarradin PM, Sarrazin J, *et al.* (in press) Hydrothermal faunal assemblages and habitat
618 characterisation at the Atlantic Eiffel Tower edifice (Lucky Strike vent field).

- 619 [20] Dattagupta S, Schaperdoth I, Montanari A, Mariani S, Kita N, Valley JW & Macalady JL (2009) A
620 novel symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a freshwater cave amphipod. *ISME J* **3**: 935-
621 943.
- 622 [21] Davis R & Moyer C (2008) Extreme spatial and temporal variability of hydrothermal microbial
623 mat communities along the Mariana Island Arc and southern Mariana back-arc system. *Journal of*
624 *Geophysical Research* **113**: B08S15.
- 625 [22] De Busserolles F, Sarrazin J, Gauthier O, Gélinas Y, Fabri M, Sarradin P & Desbruyères D (2009)
626 Are spatial variations in the diets of hydrothermal fauna linked to local environmental conditions?
627 *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*.
- 628 [23] Dedysh S, Liesack W, Khmelenina V, *et al.* (2000) *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new
629 methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-
630 pathway methanotrophs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 955.
- 631 [24] Duperron S, Fiala-Medioni A, Caprais JC, Olu K & Sibuet M (2007) Evidence for chemoautotrophic
632 symbiosis in a Mediterranean cold seep clam (*Bivalvia* : *Lucinidae*): comparative sequence analysis of
633 bacterial 16S rRNA, APS reductase and RubisCO genes. *Fems Microbiology Ecology* **59**: 64-70.
- 634 [25] Duperron S, Halary S, Lorion J, Sibuet M & Gaill F (2008) Unexpected co-occurrence of six
635 bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas* sp. (*Bivalvia*: *Mytilidae*). *Environ Microbiol*
636 **10**: 433-445.
- 637 [26] Duperron S, Sibuet M, MacGregor BJ, Kuypers MMM, Fisher CR & Dubilier N (2007) Diversity,
638 relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus*
639 mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico. *Environmental Microbiology* **9**: 1423-1438.
- 640 [27] Duperron S, Bergin C, Zielinski F, *et al.* (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species,
641 *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (*Bivalvia* : *Mytilidae*), from hydrothermal
642 vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* **8**: 1441-1447.
- 643 [28] Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space
644 complexity. *Bmc Bioinformatics* **5**: 1-19.
- 645 [29] Edwards K, Rogers D, Wirsén C & McCollom T (2003) Isolation and characterization of novel
646 psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic {alpha}- and {gamma}-Proteobacteria
647 from the deep sea. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2906.
- 648 [30] Elsaied H & Naganuma T (2001) Phylogenetic Diversity of Ribulose-1, 5-Bisphosphate
649 Carboxylase/Oxygenase Large-Subunit Genes from Deep-Sea Microorganisms. *Applied and*
650 *Environmental Microbiology* **67**: 1751-1765.

- 651 [31] Elsaied HE, Kimura H & Naganuma T (2007) Composition of archaeal, bacterial, and eukaryal
652 RuBisCO genotypes in three Western Pacific arc hydrothermal vent systems. *Extremophiles* **11**: 191-
653 202.
- 654 [32] Engel AS, Porter ML, Stern LA, Quinlan S & Bennett PC (2004) Bacterial diversity and ecosystem
655 function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by
656 chemolithoautotrophic "Epsilonproteobacteria". *FEMS Microbiology Ecology* **51**: 31-53.
- 657 [33] Fuse H, Ohta M, Takimura O, *et al.* (1998) Oxidation of trichloroethylene and dimethyl sulfide by
658 a marine Methylobacterium strain containing soluble methane monooxygenase. *Bioscience,*
659 *biotechnology, and biochemistry* **62**: 1925-1931.
- 660 [34] Galtier N, Gouy M & Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two graphic tools for sequence
661 alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 543-548.
- 662 [35] Gerasimchuk AL, Shatalov AA, Novikov AL, *et al.* (2010) The search for sulfate-reducing bacteria
663 in mat samples from the lost city hydrothermal field by molecular cloning. *Microbiology* **79**: 96-105.
- 664 [36] Gilhooly WP, Carney RS & Macko SA (2007) Relationships between sulfide-oxidizing bacterial
665 mats and their carbon sources in northern Gulf of Mexico cold seeps. *Organic Geochemistry* **38**: 380-
666 393.
- 667 [37] Goffredi SK, Jones WJ, Erlich H, Springer A & Vrijenhoek RC (2008) Epibiotic bacteria associated
668 with the recently discovered Yeti crab, *Kiwa hirsuta*. *Environmental Microbiology* **10**: 2623-2634.
- 669 [38] Haygood M (1996) The potential role of functional differences between Rubisco forms in
670 governing expression in chemoautotrophic symbioses. *Limnology and Oceanography* **41**: 370-371.
- 671 [39] Heijs SK, Damste JSS & Forney LJ (2005) Characterization of a deep-sea microbial mat from an
672 active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology*
673 *Ecology* **54**: 47-56.
- 674 [40] Heyer J, Berger U, Hardt M & Dunfield PF (2005) *Methylohalobius crimeensis* gen. nov., sp. nov.,
675 a moderately halophilic, methanotrophic bacterium isolated from hypersaline lakes of Crimea.
676 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1817-1826.
- 677 [41] Hirayama H, Sunamura M, Takai K, *et al.* (2007) Culture-Dependent and -Independent
678 Characterization of Microbial Communities Associated with a Shallow Submarine Hydrothermal
679 System Occurring within a Coral Reef off Taketomi Island, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7642-
680 7656.

- 681 [42] Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME & Murrell JC (1995) Evidence that particulate methane
682 monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *Fems Microbiology*
683 *Letters* **132**: 203-208.
- 684 [43] Huber J, Butterfield D & Baross J (2003) Bacterial diversity in a seafloor habitat following a
685 deep-sea volcanic eruption. *Fems Microbiology Ecology* **43**: 393-409.
- 686 [44] Inagaki F, Takai K, Nealson KH & Horikoshi K (2004) *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp.
687 nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -Proteobacteria isolated
688 from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1477-1482.
- 689 [45] Inagaki F, Tsunogai U, Suzuki M, *et al.* (2004) Characterization of C-1-metabolizing prokaryotic
690 communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu arc, by analyzing
691 *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, *mcrA*, and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7445-
692 7455.
- 693 [46] Jacq E, Prieur D, Nichols P, White D, Porter T & Geesey G (1989) Microscopic examination and
694 fatty acid characterization of filamentous bacteria colonizing substrata around subtidal hydrothermal
695 vents. *Archives of Microbiology* **152**: 64-71.
- 696 [47] Jannasch H & Wirsen C (1981) Morphological survey of microbial mats near deep-sea thermal
697 vents. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 528.
- 698 [48] Jannasch HW, Nelson DC & Wirsen CO (1989) Massive natural occurrence of unusually large
699 bacteria (*Beggiatoa*) at hydrothermal vent site. *Nature* **342**: 834-836.
- 700 [49] Johnson K, Childress J, Beehler C & Sakamoto C (1994) Biogeochemistry of hydrothermal vent
701 mussel communities: the deep-sea analogue to the intertidal zone. *Deep Sea Research (Part I,*
702 *Oceanographic Research Papers)* **41**: 993-1011.
- 703 [50] Kádár E, Bettencourt R, Costa V, Santos R, Lobo-da-Cunha A & Dando P (2005) Experimentally
704 induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus*
705 *azoricus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **318**: 99-110.
- 706 [51] Kalanetra KM, Huston SL & Nelson DC (2004) Novel, Attached, Sulfur-Oxidizing Bacteria at
707 Shallow Hydrothermal Vents Possess Vacuoles Not Involved in Respiratory Nitrate Accumulation.
708 *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7487-7496.
- 709 [52] Kato S, Kobayashi C, Kakegawa T & Yamagishi A (2009) Microbial communities in iron-silica-rich
710 microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental*
711 *Microbiology* **11**: 2094-2111.

- 712 [53] Kirchman D (2002) The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *Fems*
713 *Microbiology Ecology* **39**: 91-100.
- 714 [54] Kolganova T, Kuznetsov B & Tourova T (2002) Designing and testing oligonucleotide primers for
715 amplification and sequencing of archaeal 16S rRNA genes. *Microbiology* **71**: 243-246.
- 716 [55] Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB & Stahl DA (2005) Isolation of
717 an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- 718 [56] Lane D (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* **1**: 115–
719 176.
- 720 [57] Lane D, Pace B, Olsen G, Stahl D, Sogin M & Pace N (1985) Rapid determination of 16S ribosomal
721 RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6955-6659.
- 722 [58] Larimer F, Lu T & Bailey D (1995) Sequence and expression of the form II ribulose biphosphate
723 carboxylase/oxygenase (RUBISCO) gene from *Rhodobacter capsulatus*. *FASEB J* **9**: A1275.
- 724 [59] Lee Van Dover C, Desbruyères D, Segonzac M, Comtet T, Saldanha L, Fiala-Medioni A & Langmuir
725 C (1996) Biology of the Lucky Strike hydrothermal field. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic*
726 *Research Papers* **43**: 1509-1529.
- 727 [60] Lloyd K, Albert D, Biddle J, Chanton J, Pizarro O & Teske A (2010) Spatial Structure and Activity of
728 Sedimentary Microbial Communities Underlying a *Beggiatoa* spp. Mat in a Gulf of Mexico
729 Hydrocarbon Seep.
- 730 [61] Loaëc M, Olier R & Guezennec J (1998) Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from
731 deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Polymers* **35**: 65-70.
- 732 [62] Longnecker K & Reysenbach A-L (2001) Expansion of the geographic distribution of a novel
733 lineage of [epsi]-Proteobacteria to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS*
734 *Microbiology Ecology* **35**: 287-293.
- 735 [63] Lopez-Garcia P, Gaill F & Moreira D (2002) Wide bacterial diversity associated with tubes of the
736 vent worm *Riftia pachyptila*. *Environmental Microbiology* **4**: 204-215.
- 737 [64] Lopez-Garcia P, Lopez-Lopez A, Moreira D & Rodriguez-Valera F (2001) Diversity of free-living
738 prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *Fems Microbiology Ecology* **36**: 193.
- 739 [65] Lösekann T, Robador A, Niemann H, Knittel K, Boetius A & Dubilier N (2008) Endosymbioses
740 between bacteria and deep-sea siboglinid tubeworms from an Arctic Cold Seep(Haakon Mosby Mud
741 Volcano, Barents Sea). *Environmental Microbiology* **10**: 3237-3254.

742 [66] Martins I, Colaço A, Santos R, Lesongeur F, Godfroy A, Sarradin P & Cosson R (2009) Relationship
743 between the occurrence of filamentous bacteria on *Bathymodiolus azoricus* shell and the
744 physiological and toxicological status of the vent mussel. *Journal of Experimental Marine Biology and*
745 *Ecology* **376**: 1-6.

746 [67] Meyer B & Kuever J (2007) Molecular Analysis of the Diversity of Sulfate-Reducing and Sulfur-
747 Oxidizing Prokaryotes in the Environment, Using *aprA* as Functional Marker Gene. *Applied and*
748 *Environmental Microbiology* **73**: 7664-7679.

749 [68] Meyer B & Kuever J (2007) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory
750 adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfur-oxidizing prokaryotes.
751 *Microbiology* **153**: 3478-3498.

752 [69] Meyer B & Kuever J (2007) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory
753 adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and
754 evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**: 2026-2044.

755 [70] Meyer B, Imhoff JF & Kuever J (2007) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the
756 *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system.
757 *Environmental Microbiology* **9**: 2957-2977.

758 [71] Moyer C, Dobbs F & Karl D (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a
759 microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ.*
760 *Microbiol.* **61**: 1555-1562.

761 [72] Mukhopadhyaya P, Deb C, Lahiri C & Roy P (2000) A *soxA* gene, encoding a diheme cytochrome
762 *c*, and a *sox* locus, essential for sulfur oxidation in a new sulfur lithotrophic bacterium. *Journal of*
763 *Bacteriology* **182**: 4278.

764 [73] Muller F, Brissac T, Le Bris N, Felbeck H & Gros O (2010) First description of giant Archaea
765 (Thaumarchaeota) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat.
766 *Environmental Microbiology* **12**: 2371-2383.

767 [74] Nelson DC, Wirsén CO & Jannasch HW (1989) Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa*
768 *sp.* abundant at hydrothermal vent of Guayamas basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2909-2917.

769 [75] Nercessian O, Bienvenu N, Moreira D, Prieur D & Jeanthon C (2005) Diversity of functional genes
770 of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments.
771 *Environmental Microbiology* **7**: 118-132.

- 772 [76] Nold SC, Zhou J, Devol AH & Tiedje JM (2000) Pacific Northwest Marine Sediments Contain
773 Ammonia-Oxidizing Bacteria in the beta Subdivision of the Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*
774 **66**: 4532-4535.
- 775 [77] Omoregie EO, Mastalerz V, de Lange G, *et al.* (2008) Biogeochemistry and community
776 composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefred mud volcano (Nile Deep
777 Sea fan, Eastern Mediterranean). *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3198-3215.
- 778 [78] Petri R, Podgorsek L & Imhoff JF (2001) Phylogeny and distribution of the soxB gene among
779 thiosulfate-oxidizing bacteria. *Fems Microbiology Letters* **197**: 171-178.
- 780 [79] Rabus R, Hansen T & Widdel F (2006) Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. *The*
781 *prokaryotes* **2**: 659–768.
- 782 [80] Reysenbach AL, Longnecker K & Kirshtein J (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an
783 in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and*
784 *Environmental Microbiology* **66**: 3798-3806.
- 785 [81] Riou V (2009) Nutritional plasticity in a deep-sea dualendosymbiotic suspension feeding mussel:
786 *Bathymodiolus azoricus* from MAR hydrothermal vents. Thesis, Vrije Universiteit Brussel
787 Universidade dos Açores.
- 788 [82] Roussel E, Sauvadet AL, Allard J, Chaduteau C, Richard P, Cambon-Bonavita MA & Chaumillon E
789 (2009) Archaeal Methane Cycling Communities Associated with Gassy Subsurface Sediments of
790 Marennes-Oléron Bay (France). *Geomicrobiology (in press)* **26**.
- 791 [83] Salerno JL, Macko SA, Hallam SJ, Bright M, Won YJ, McKiness Z & Van Dover CL (2005)
792 Characterization of symbiont populations in life-history stages of mussels from chemosynthetic
793 environments. *Biological Bulletin* **208**: 145-155.
- 794 [84] Santelli C, Orcutt B, Banning E, *et al.* (2008) Abundance and diversity of microbial life in ocean
795 crust. *Nature* **453**: 653-656.
- 796 [85] Sarradin P-M, Caprais J-C, Riso R, Kerouel R & Aminot A (1999) Chemical environment of the
797 hydrothermal mussel communities in the Lucky Strike and Menez Gwen vent fields, Mid Atlantic
798 Ridge. *Cahier de Biologie Marine* **40**: 93-104.
- 799 [86] Sarradin P, Waeles M, Bernagout S, Le Gall C, Sarrazin J & Riso R (2009) Speciation of dissolved
800 copper within an active hydrothermal edifice on the Lucky Strike vent field (MAR, 37° N). *Science of*
801 *the Total Environment* **407**: 869-878.

802 [87] Schloss PD & Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining
803 operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental*
804 *Microbiology* **71**: 1501-1506.

805 [88] Schwedock J, Harmer TL, Scott KM, *et al.* (2004) Characterization and expression of genes from
806 the RubisCO gene cluster of the chemoautotrophic symbiont of *Solemya velum*: cbbLSQO. *Archives of*
807 *Microbiology* **182**: 18-29.

808 [89] Seckbach J & Oren A (2009) Microbial mats: modern and ancient microorganisms in stratified
809 systems (hardback)(series: cellular origin, life in extreme habitats and.

810 [90] Shigematsu T, Hanada S, Eguchi M, Kamagata Y, Kanagawa T & Kurane R (1999) Soluble methane
811 monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading *Methylomonas* sp. strains and
812 detection of methanotrophs during in situ bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*
813 **65**: 5198.

814 [91] Stevens H, Stubner M, Simon M & Brinkhoff T (2005) Phylogeny of Proteobacteria and
815 Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *Fems Microbiology Ecology* **54**: 351-365.

816 [92] Takai K, Suzuki M, Nakagawa S, Miyazaki M, Suzuki Y, Inagaki F & Horikoshi K (2006)
817 *Sulfurimonas parvalinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing
818 chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent
819 polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb.
820 nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1725-1733.

821 [93] Takai K, Campbell BJ, Cary SC, *et al.* (2005) Enzymatic and Genetic Characterization of Carbon
822 and Energy Metabolisms by Deep-Sea Hydrothermal Chemolithoautotrophic Isolates of
823 Epsilonproteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7310-7320.

824 [94] Teske A & Nelson DC (2006) The Genera *Beggiatoa* and *Thioploca*. *Prokaryotes* **6**: 784-810.

825 [95] Teske A & Sorensen KB (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have
826 we caught them all? *ISME J* **2**: 3-18.

827 [96] Teske A, Brinkhoff T, Muyzer G, Moser DP, Rethmeier J & Jannasch HW (2000) Diversity of
828 thiosulfate-oxidizing bacteria from marine sediments and hydrothermal vents. *Applied and*
829 *Environmental Microbiology* **66**: 3125-3133.

830 [97] Van Dover CL, Jenkins CD & Turnipseed M (2001) Corraling of larvae in the deep sea. *Journal of*
831 *the Marine Biological Association of the United Kingdom* **81**: 823-826.

- 832 [98] Vrijenhoek RC, Duhaime M & Jones WJ (2007) Subtype Variation Among Bacterial
833 Endosymbionts of Tubeworms (Annelida: Siboglinidae) from the Gulf of California. *Biol Bull* **212**: 180-
834 184.
- 835 [99] Webster G, Newberry CJ, Fry JC & Weightman AJ (2003) Assessment of bacterial community
836 structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale.
837 *Journal of Microbiological Methods* **55**: 155-164.
- 838 [100] Wintzingerode F, Göbel U & Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in
839 environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 213-229.
- 840 [101] Won Y-J, Hallam SJ, O'Mullan GD, Pan IL, Buck KR & Vrijenhoek RC (2003) Environmental
841 Acquisition of Thiotrophic Endosymbionts by Deep-Sea Mussels of the Genus *Bathymodiolus*. *Appl.*
842 *Environ. Microbiol.* **69**: 6785-6792.
- 843 [102] Won Y, Jones W & Vrijenhoek R (2008) Absence of cospeciation between deep-sea Mytilids and
844 their thiotrophic endosymbionts. *Journal of Shellfish Research* **27**: 129-138.
- 845 [103] Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, *et al.* (2008) New insights on the metabolic diversity among the
846 epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of*
847 *Experimental Marine Biology and Ecology* **359**: 131-140.

Tables

850 **Table 1.** Analysis of bacterial and archaeal diversity in Lucky Strike microbial mat.
 851

Library	Number of clones	OTUs number (at 97% similarity)	Good's coverage (%)	1-H_{Simpson}*
Archaeal	61	4	96.7	0.157
Archaeal transcripts	22	1	100	0
Bacterial	323	162	55.1	0.988
Bacterial transcripts	76	3	97.4	0.152

852 *Simpson indice values are presented as 1-D for best readability, the diversity increasing from 0 (one
 853 specie) to 1 (maximal diversity).

854 **Table 2.** Phylogenetic positioning and abundance of bacterial clones sequenced from 16S RNA
 855 transcript library.
 856

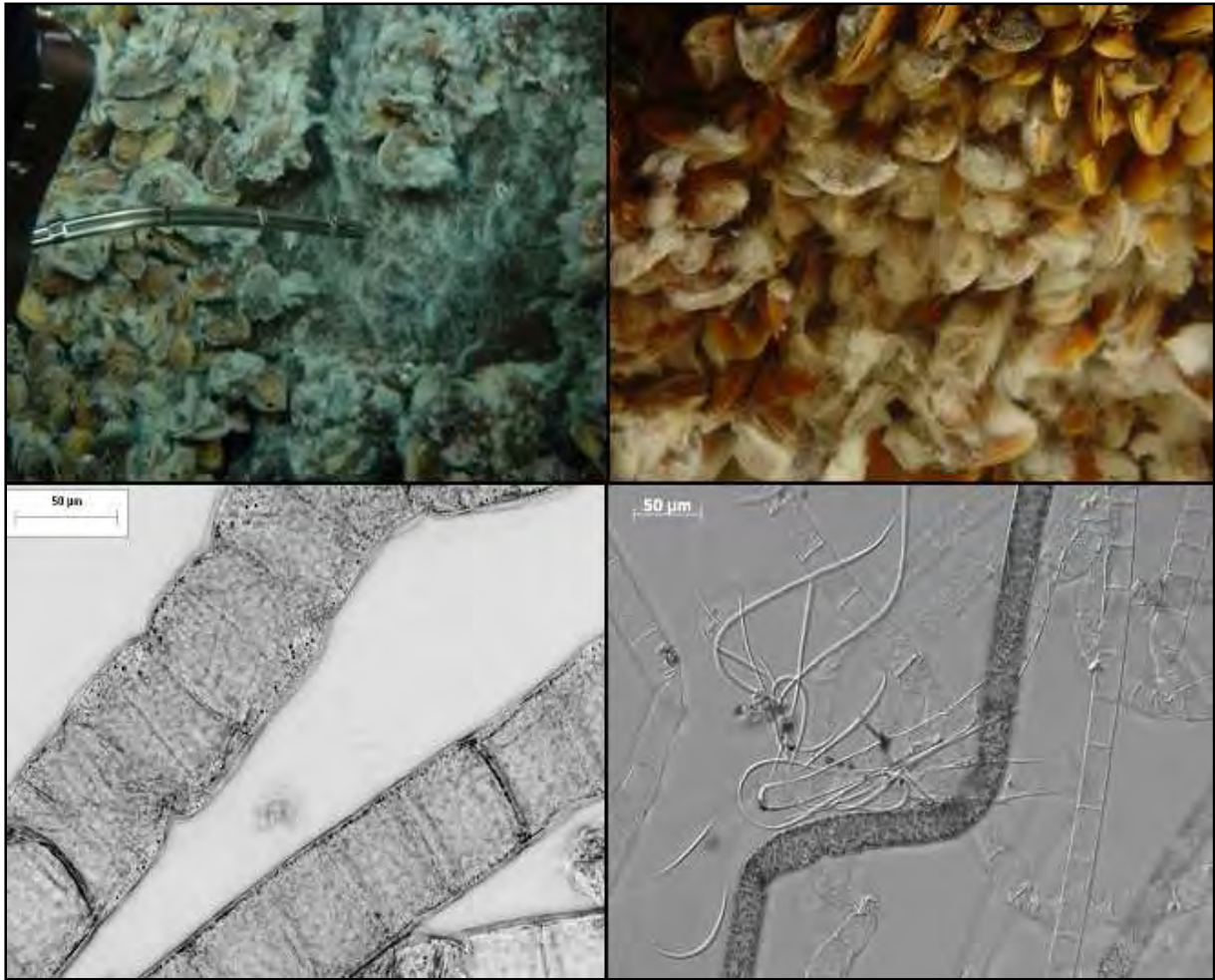
Clone designation	Number clones	Phylogenetic group	Nearest relative (NCBI GenBank)	Similarity (%)
LSmat_RNA.B01	74	<i>Thiotrichales</i> (gamma)	White Point filamentous bacterium (AY496953)	99
		<i>Thiotrichales</i> (gamma)	Escanaba Trough filamentous bacterium (AY883934)	99
LSmat_RNA.B02	1	Undetermined	Lost City uncultivated clone (DQ270612)	95
LSmat_RNA.B03*	1	Unclassified bacteria	Bacterium clone EPR3968-O8a-Bc54 (EU491721)	95

857 *partial sequence (200pb)

858 **Table 3.** Phylogenetic positioning and abundance of bacterial OTUs for the Lucky Strike microbial
859 mats.
860

Phylogenetic group	Number of related clones	Number of OTUs (level 97%)
<i>Alphaproteobacteria</i>	36 (11%)	
<i>Rhodobacterales</i>	27	
<i>Rhizobiales</i>	7	21 (13%)
Unaffiliated alpha clones from	2	
<i>Gammaproteobacteria</i>	88 (28%)	
<i>Thiotrichales</i>	7	
<i>Methylobacterales</i>	3	
<i>Methylococcales</i>	1	
<i>Oceanospirillales</i>	2	44 (27%)
<i>Alteromonadales</i>	2	
<i>Bathymodiolus azoricus</i> methanotrophic symbiont	2	
Unaffiliated gamma clones	70	
<i>Deltaproteobacteria</i>	13 (4%)	
<i>Desulfurobacterales</i>	2	
<i>Mycococcales</i>	6	8 (5%)
Unaffiliated delta clones	5	
<i>Epsilonproteobacteria</i>	81 (25%)	
<i>Helicobacteraceae</i>	16	29 (18%)
Group F	65	
<i>Bacteroidetes</i>	82 (25%)	
<i>Flavobacteriales</i>	72	44 (27%)
<i>Sphingobacteriales</i>	10	
<i>Planctomycetes</i>	8 (2%)	7 (4%)
<i>Chloroflexi</i>	7 (2%)	6 (4%)
<i>Actinomycetes</i>	4 (1%)	2 (1%)
<i>Chlorobi</i>	2 (<1%)	1 (<1%)
<i>Verrucomicrobia</i>	2 (<1%)	1 (<1%)
Total	323 (100%)	163 (100%)

Figures



862
863
864
865
866

Fig. 1. White filamentous mats on *Bathymodiolus azoricus* mussels from the Lucky Strike vent field (top left and right) (Ifremer[®], ExoMAR and Bathyluck cruise, 2005 and 2009). Light and differential interference contrast micrographs of large Lucky Strike's mat filaments (bottom left and right, respectively). Bar, 50 µm.

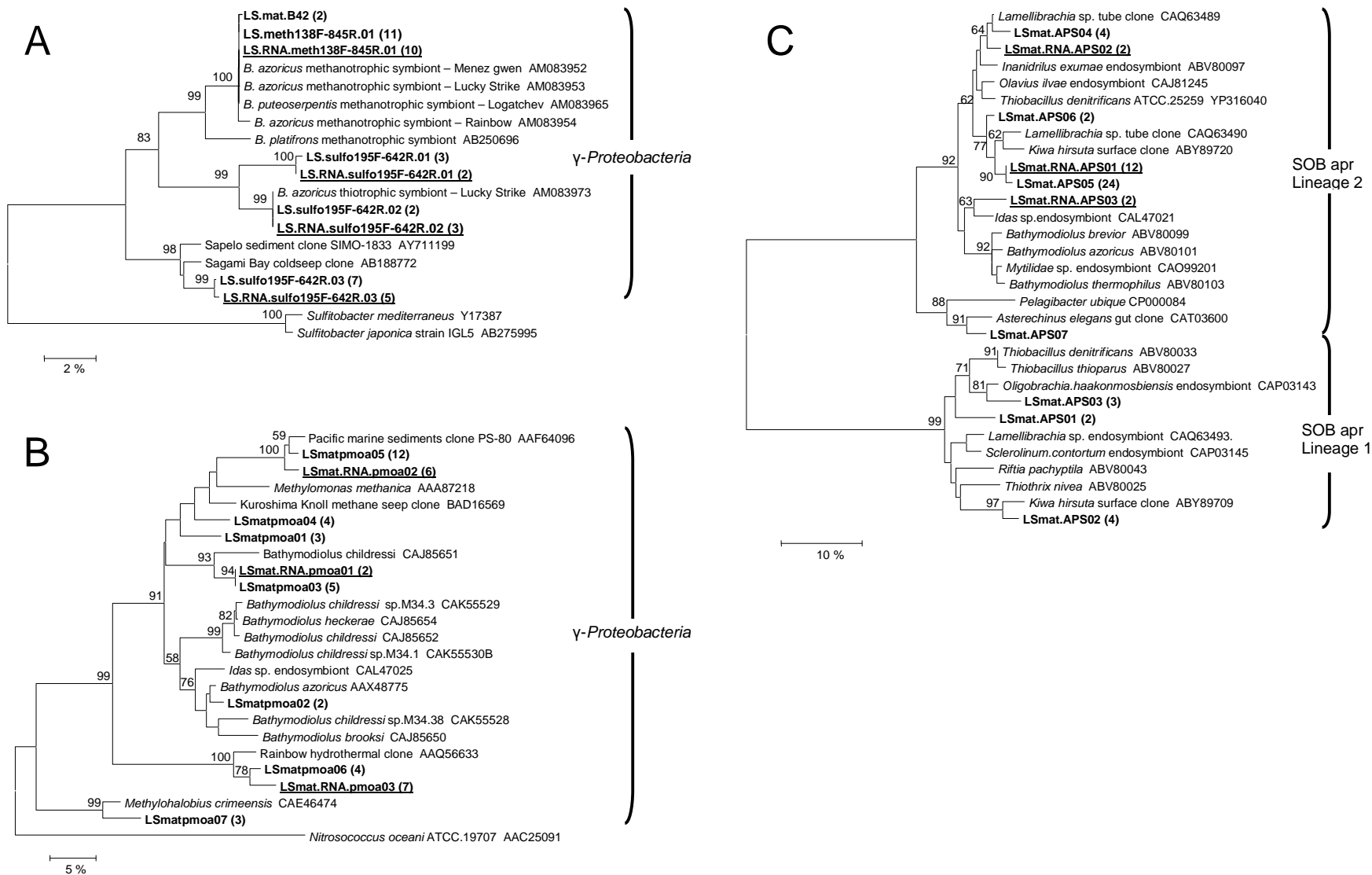


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rRNA genes sequences obtained with domain-specific *Bathymodiolus* sp. symbionts in PCR and RT-PCR as determined by analysis and neighbor joining algorithm (A). Neighbor-joining phylogenetic analysis with PAM correction of the amino acid sequences deduced from a fragment of the gene encoding for the particulate methane monooxygenase (LSmat.pmoA#) and for the adenosine 5'-phosphosulfate reductase alpha-sub-unit (LSmat.aprA#) from Lucky Strike mats (B and C, respectively). Percentages greater than 60% of bootstrap resampling (of 1,000 resamplings) that support each topological element are indicated near the nodes. Representative sequences obtained in this study are in bold and RNA transcript sequences are also underlined. Numbers in brackets indicate the number of identical clones.

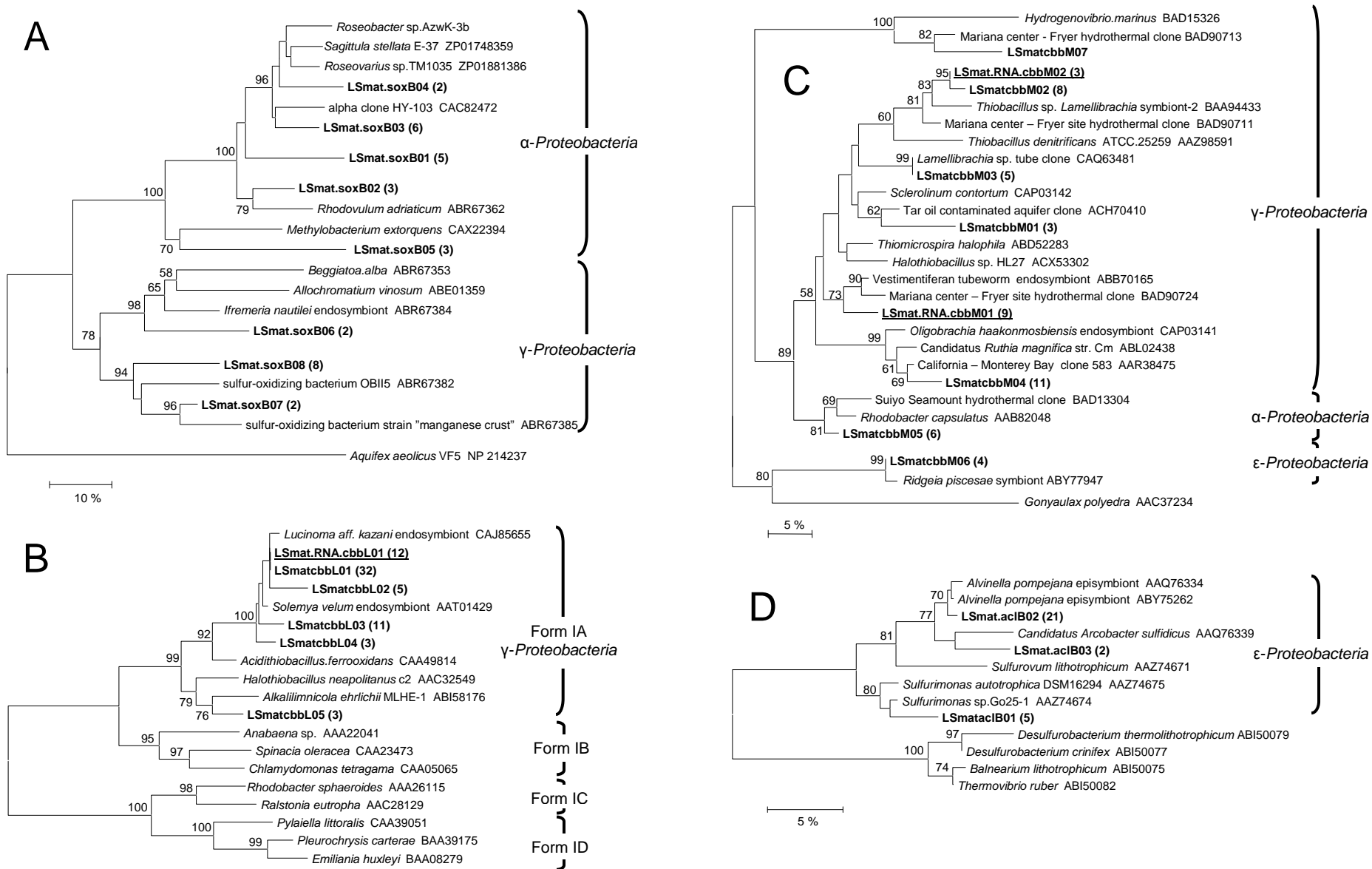


Fig. 3. Neighbor-joining phylogenetic analysis with PAM correction of the amino acid sequences deduced from a fragment of the gene encoding for an element of the periplasmic thiosulfate-oxidizing Sox enzyme complex (L_{Smat}.soxB#), the RuBisCO form 1 and 2 (L_{Smat}.cbbL/M#) and the beta subunit of ATP citrate lyase (L_{Smat}.aclB#) (A,B, C and D, respectively). Percentages greater than 60% of bootstrap resampling (of 1,000 resamplings) that support each topological element are indicated near the nodes. Representative sequences obtained in this study are in bold and RNA transcript sequences are also underlined. Numbers in brackets indicate the number of identical clones.

Supplementary data

871 **Table 4.** Mean value of T, Σ S, CH₄, and pH and their standard deviations (stdev) measured or
 872 estimated on different habitats identified at Eiffel Tower hydrothermal edifice: Assemblage 1: Dense
 873 *Bathymodiolus azoricus* beds (the mussels are of the larger size class, in general >4 cm), occasionally
 874 patchy microbial mats can be present; Assemblage 2b: *Bathymodiolus azoricus* clumps (in this case
 875 the mussels are almost always less than 4 cm in length) separated with visible microbial mats;
 876 Substratum 1b are presents bare dark brownish, sometimes slightly reddish surfaces with visible
 877 microbial mats.
 878

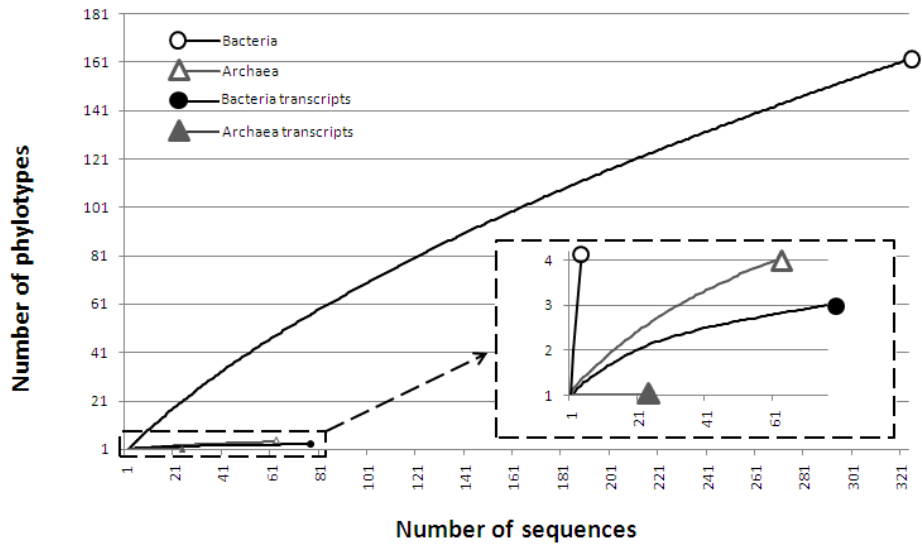
	T°C	ΣS total μM	CH₄ total μm (estimated)	pH (estimated)
	Mean\pmstdev	Mean\pmstdev	Mean\pmstdev	Mean\pmstdev
Assemblage1	5.08 \pm 0.37	1.72 \pm 0.73	5.59 \pm 0.75	7.03 \pm 0.18
Assemblage 2b	4.67 \pm 0.14	0.81 \pm 0.29	4.76 \pm 0.28	7.24 \pm 0.09
Substratum 1b	5.5*	No data		

879 *punctual measure during sampling

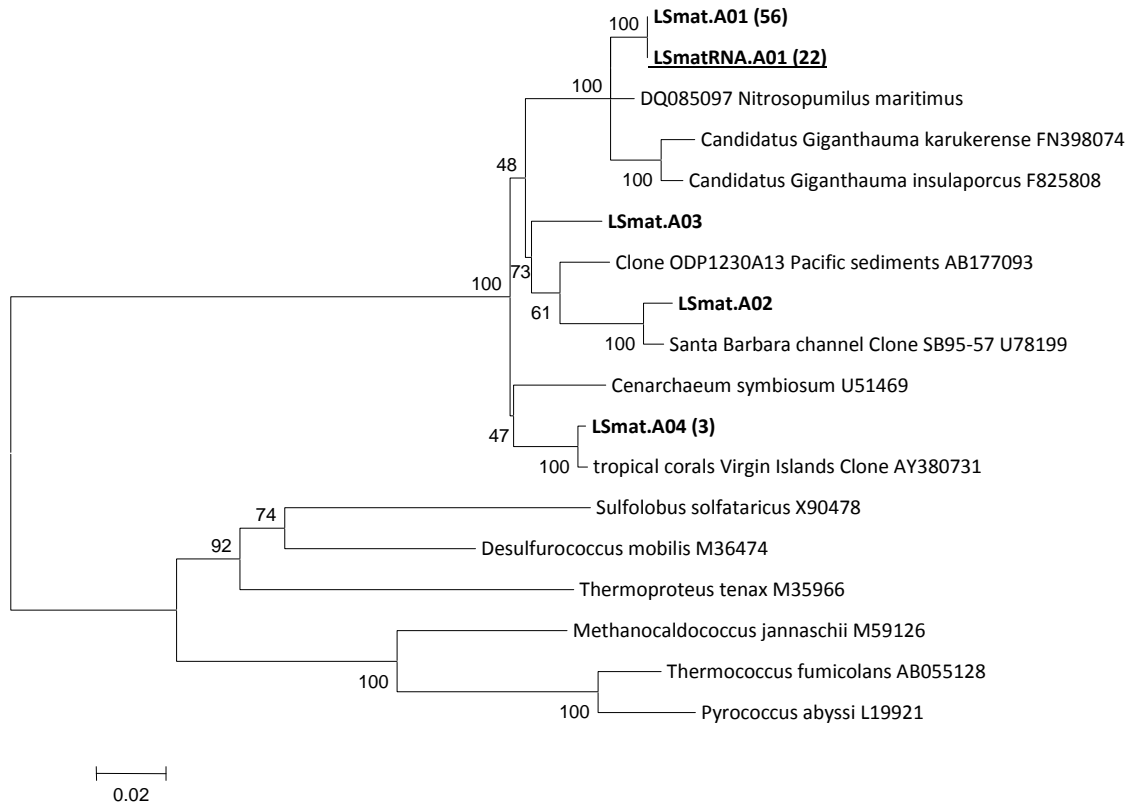
880 **Table 5.** Primers used during the study
881

Designation	Specificity	Primer sequence 5'-3'	reference
U1492 R	Universal 16S rDNA	GTT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT	(Lane, 1991)
E8 F	Bacterial 16S rDNA	AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG	
A8 F	Archaeal 16S rDNA	CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA-3'	(Kolganova et al., 2002)
907 R	Universal 16S rDNA	CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT	(Lane et al., 1985)
Meth138F	16S rDNA Methanotroph <i>Bathymodiolus</i> sp. symbiont	TCT-GCC-TAT-TAG-TGG-GGG-ACA-ACA-TGG-T	(Boutet, in press)
Meth845R		GCT-CCG-CCA-CTA-AGC-CTA-TAA-ATA-GAC-C	
Sulfo195F	16S rDNA Thirotroph <i>Bathymodiolus</i> sp. symbiont	CTC-TAT-GGA-GTA-AAG-TGG-AGG-ACC-TTC-G	(Boutet, in press)
Sulfo642R		CCT-ATA-CTC-TAG-TTT-GCC-AGT-TTC-AA	
<i>cbbL</i> _1b F	RuBisCO form 1	CAC-CTG-GAC-CAC-VGT-BTG-G	
<i>cbbL</i> _2c R	RuBisCO form 1	CGG-TGY-ATG-TGC-AGC-AGC-ATI-CCG	
<i>cbbM1</i> _Els F	RuBisCO form 2	ATC-ATC-AAR-CCS-AAR-CTS-GGC-CTG-CGT-CC	(Blazejak et al., 2006)
<i>cbbM</i> _2b R	RuBisCO form 2	MGA-GGT-SAC-SGC-RCC-RTG-RCC-RGC-MCG-RTG	
<i>cbbM2</i> _Els R	RuBisCO form 2	MGA-GGT-GAC-SGC-RCC-GTG-RCC-RGC-MCG-RTG	
<i>acIB</i> 892 F	ATP-citrate lyase β sub-unit	TGG-ACM-ATG-GTD-GCY-GGK-GGT	(Campbell et al., 2003)
<i>acIB</i> R	ATP-citrate lyase β sub-unit	ATA-GTT-KGG-SCC-ACC-TCT-TC	
APS1 F	adenosine 5'phospho-sulfate reductase alpha-sub-unit	TGG-CAG-ATC-ATG-ATY-MAY-GG	(Meyer and Kuever, 2007b)
APS4 R		GCG-CCA-ACY-GGR-CCR-TA	
<i>soxB</i> 432F	SoxB component of the periplasmic thiosulfate-oxidizing Sox enzyme complex	GAY-GGN-GGN-GAY-CAN-TGG	(Petri et al., 2001)
<i>soxB</i> 693F		ATC-GGN-CAR-GCN-TTY-CCN-TA	
<i>soxB</i> 1164R		AAR-TTN-CCN-CGN-CGR-TA	
<i>soxB</i> 1446R		CAT-GTC-NCC-NCC-RTG-YTG	
A189 F	particular pMMo	GGN-GAC-TGG-GAC-TTC-TGG	(Holmes et al., 1995)
MB661 R	particular pMMo	CCG-GMG-CAA-CGT-CYT-TAC-C	

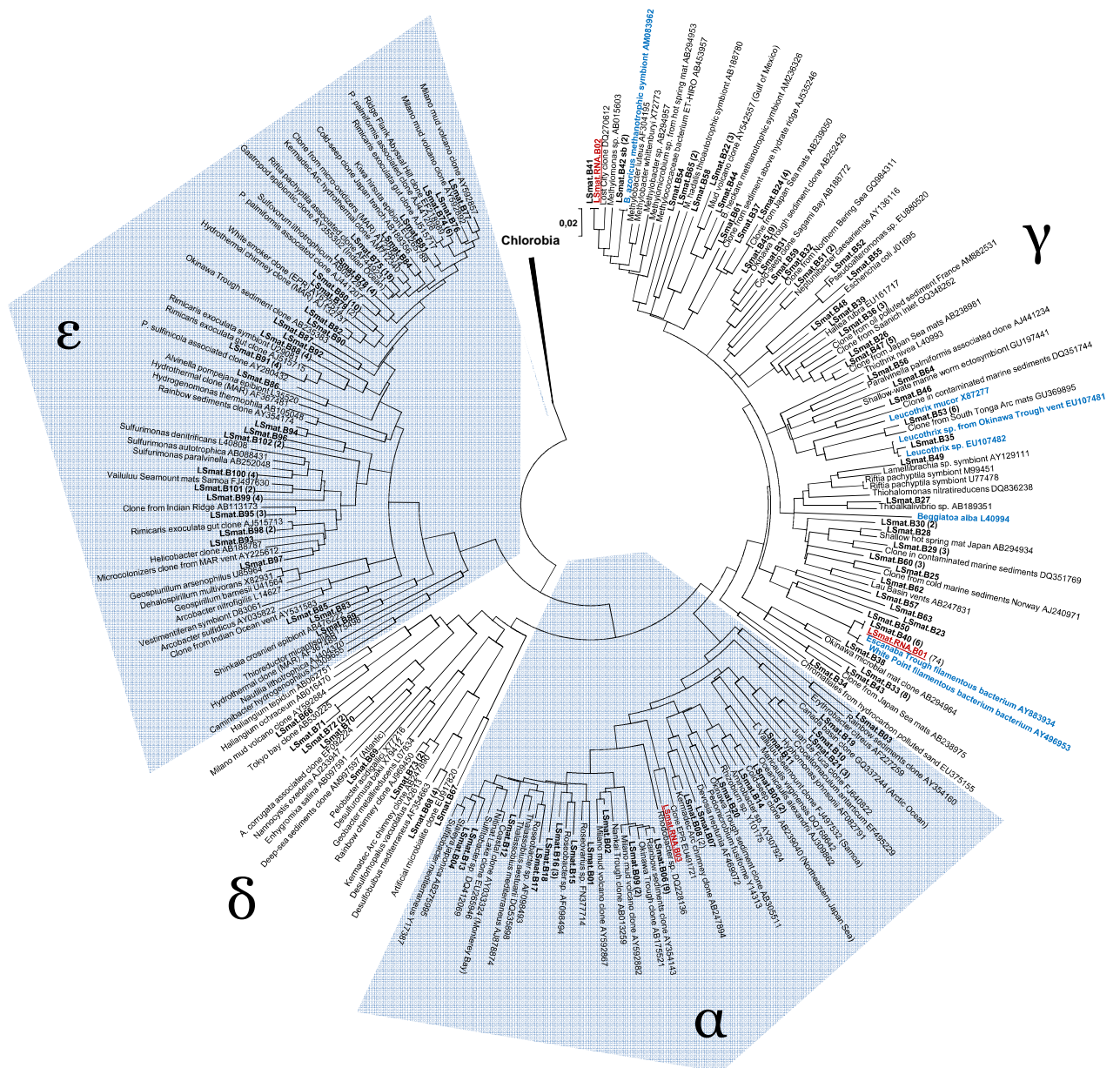
882



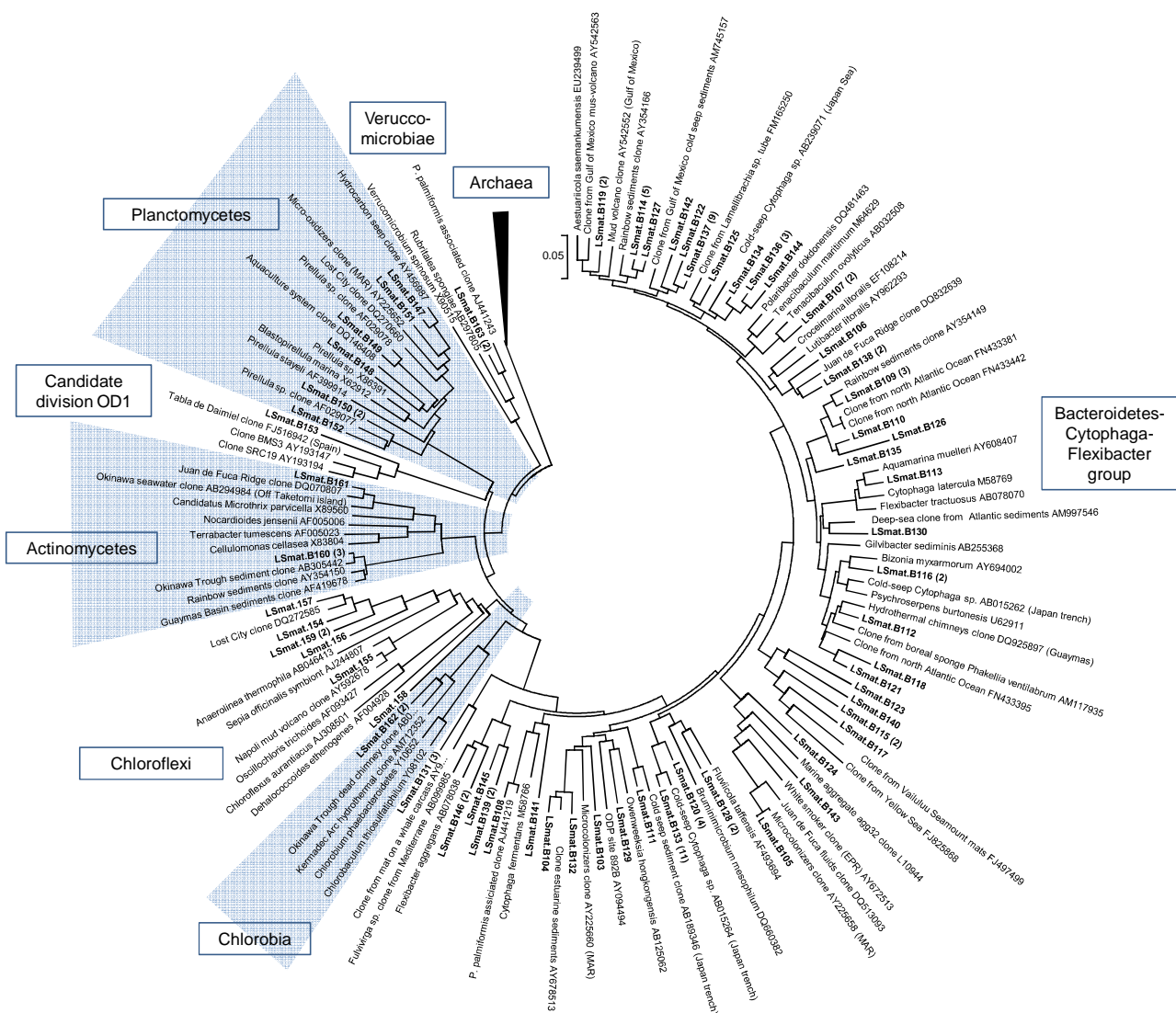
883
 884 **Fig. 4.** Rarefaction curves of the diversity determined for the bacterial and archaeal 16S rRNA gene
 885 and transcript libraries defined at 97% of similarity threshold.



886
 887 **Fig. 5.** Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rRNA genes sequences obtained with
 888 *Archaea* universal 16S rRNA gene primers as determined by analysis and neighbor joining algorithm.
 889 Percentages greater than 60% of bootstrap resampling (of 1,000 resamplings) that support each
 890 topological element are indicated near the nodes. Representative sequences obtained in this study
 891 are in bold and RNA transcript sequences are also underlined. Numbers in brackets indicate the
 892 number of identical clones.

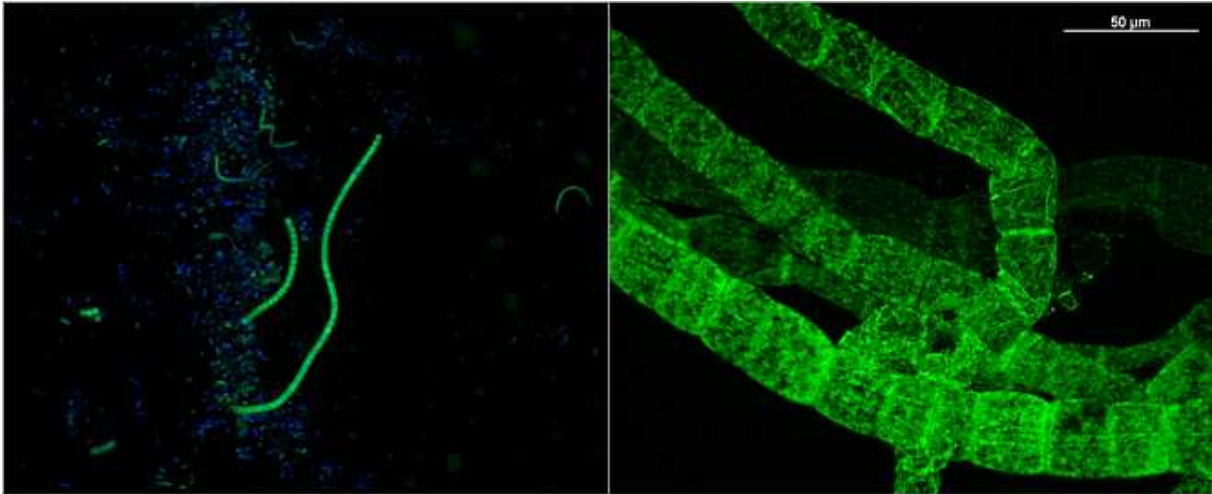


893
 894 **Fig. 6.** Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rRNA gene sequences of *Proteobacteria*
 895 obtained with *Bacteria* universal 16S rRNA gene primers as determined by analysis and neighbor
 896 joining algorithm. Representative sequences obtained in this study are in bold and RNA transcript
 897 sequences are also red and underlined. Bank sequences with particular interest (*Thiotrichales* and
 898 *Bathymodiolus* symbionts) are in blue and bold. Numbers in brackets indicate the number of identical
 899 clones.



900
901
902
903
904

Fig. 7. Phylogenetic tree showing the relationship of 16S rRNA genes sequences obtained with *Bacteria* universal 16S rRNA gene primers as determined by analysis and neighbor joining algorithm. Sequences affiliated to Proteobacteria don't appear in this tree (cf. Fig 2). Representative sequences obtained in this study are in bold. Numbers in brackets indicate the number of identical clones.



905
906
907
908
909
910
911

Fig. 8. Whole-cell hybridization of various bacteria by application of fluorescently TRITC-labeled probe (GAM42a) for the *Gammaproteobacteria* (in green). Bar, 50 μm (same for both pictures). The autofluorescence and the important fragility of large vacuolated cells (Kalanetra et al., 2004), in addition to the difference of scale between them and the others microbial populations in mats, avoided us having pertinent results with the FISH yet.

3.2. Résultats complémentaires

3.2.1. Observations *in situ* et en microscopie

- ❖ **Planche I.** Photographies réalisées durant les campagnes océanographiques EXOMAR et Bathyluck.

Haut à gauche : paroi de l'édifice Tour Eiffel recouverte de tapis microbiens (substrat 1b) ; échelle : environ 2*3 m.

Haut à droite : tapis sur substrat 1b ; échelle : environ 50*70 cm.

Bas à gauche : tapis sur substrat 1b ; échelle : environ 8*12 cm.

Bas à droite : tapis sur substrat 2b (bouquets de moules espacées et tapis) ; échelle : 35*60 cm.

- ❖ **Planche II.** Photographies réalisées durant les campagnes océanographiques MoMARETO et MoMAR-08.

Haut à gauche : bancs de moules recouvertes ou non de tapis microbien (assemblage 1) au Sud de Tour Eiffel ; échelle : environ 3*5 m.

Haut à droite : moulière partiellement recouverte de tapis (assemblage 1) sur la paroi Sud de Tour Eiffel ; échelle : environ 1*1,5 m.

Bas à gauche : zoom sur cette même moulière durant un prélèvement avec le PEP ; échelle : environ 40*60 cm.

Bas à droite : moules recouvertes de tapis ; échelle : environ 8*11 cm.

- ❖ **Planche III.** Images de tapis microbiens en microscopie électronique à balayage.

Haut à gauche : morceau de coquille de moule recouverte d'un tapis microbien et d'un copépode. Les EPS empêchent de bien visualiser les tapis ; échelle : 2 mm.

Haut à droite : grossissement du même échantillon ; échelle : 500 µm.

Bas à gauche : filtre 0,2 µm sur lequel un échantillon de tapis a été fixé par aspiration à l'aide d'une pompe manuelle. Les filaments de grande taille (20-70 µm de diamètre), affiliés aux *Beggiatoa*, n'ont pas supporté l'aspiration : ils forment des structures aplaties qui permettent de visualiser les filaments de taille inférieure ; échelle : 300 µm.

Bas à droite : sur le même échantillon, grossissement d'un ensemble de filaments de plus petite taille (2-4 μm de diamètre) ; échelle : 50 μm .

❖ **Planche IV.** Hybridation fluorescente *in situ* sur des coupes de tapis microbiens inclus en résine.

Haut : détails d'une coupe de coquille de moule recouverte de tapis permettant de visualiser les différentes morphologies présentes en dehors des filaments de grande taille. Ces échantillons ont été colorés au DAPI et hybridés avec une sonde spécifique des *Gammaproteobacteria* (gam42a) possédant le fluorochrome cy3 (vert) ; échelle : 10 μm .

Bas à gauche : reconstitution en trois dimensions de filaments bactériens composant les tapis. L'intégrité de la structure des plus grands filaments n'a pas été préservée lors de la coupe au microtome. Cet échantillon a été hybridé avec une sonde eubactérie (eub338) marquée en cy3 (vert).

Bas à droite : détail. Cet échantillon a été hybridé avec une sonde eubactérie (eub338) marquée en cy5 (rouge) et par une sonde spécifique des *Gammaproteobacteria* (gam42a) marquée en cy3 (vert). Les filaments hybridant les deux sondes apparaissent en orange. Les filaments apparaissant en rouge ont été hybridés par la sonde eubactérie, mais pas par la sonde *Gammaproteobacteria*; échelle : 5 μm .

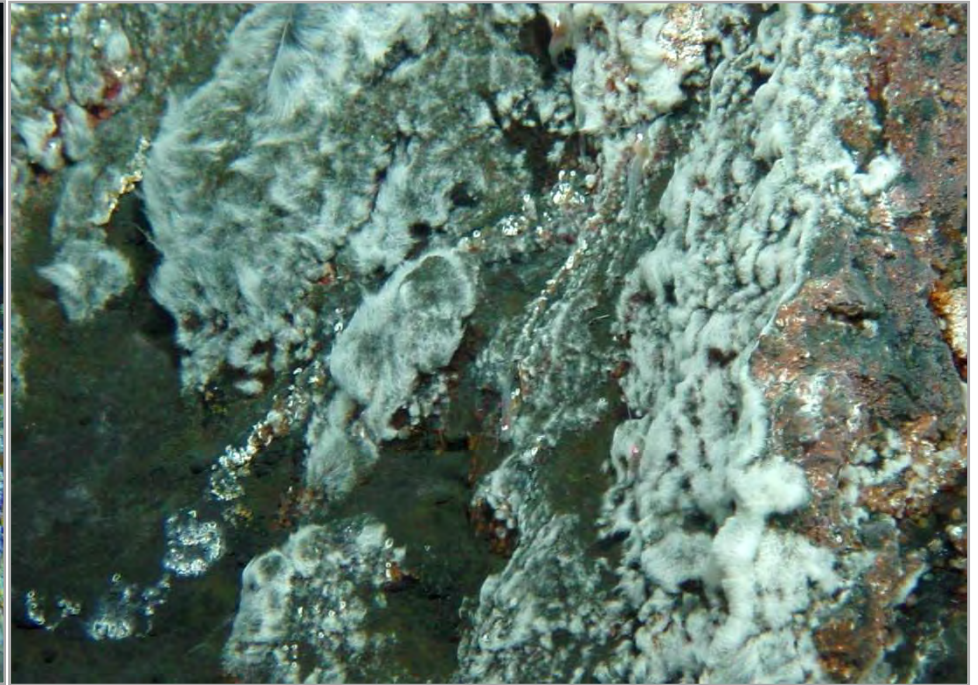
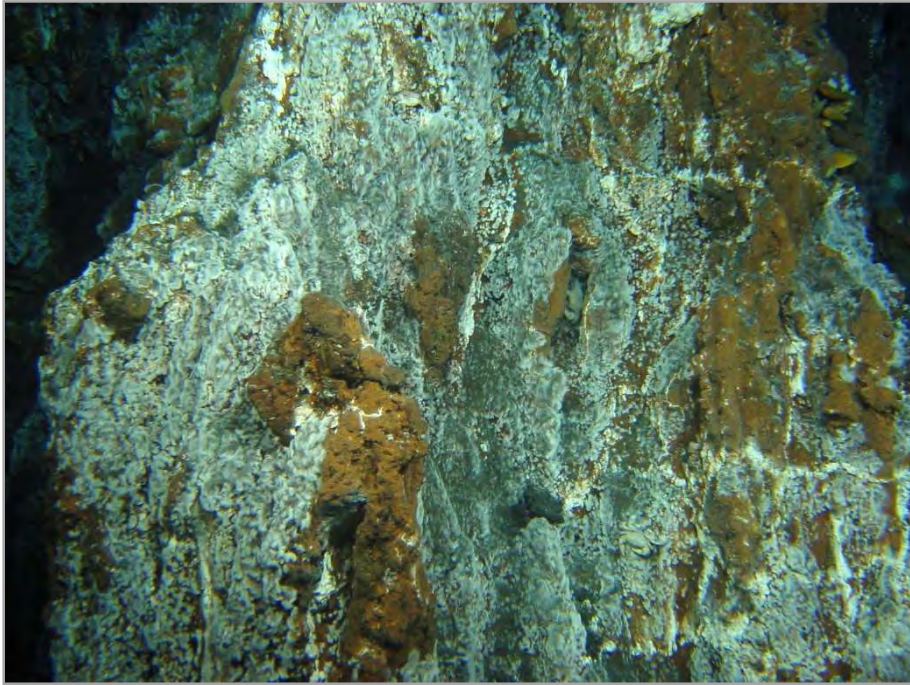


Planche I

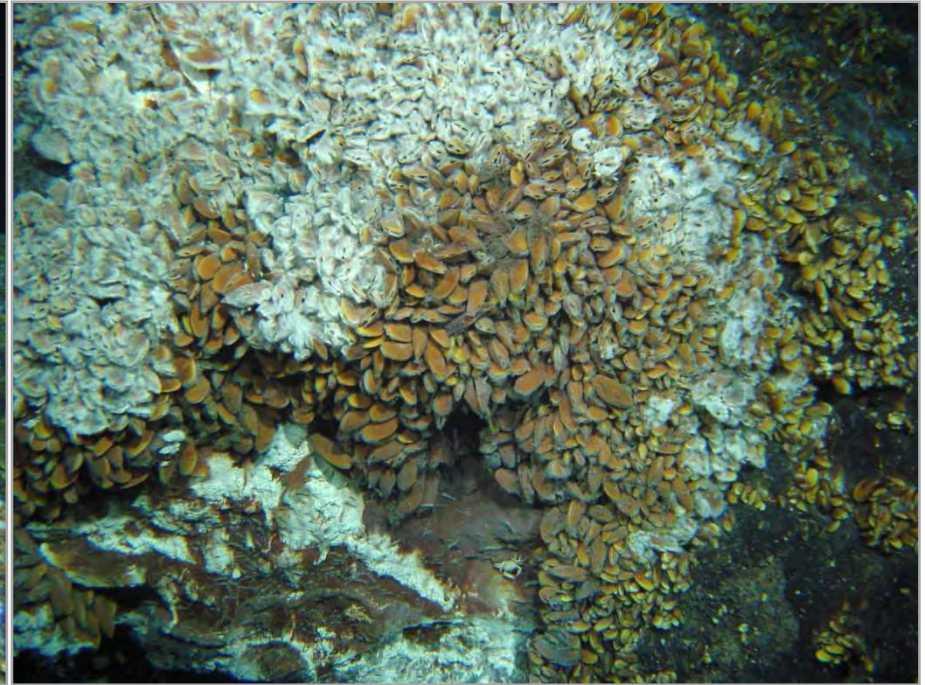
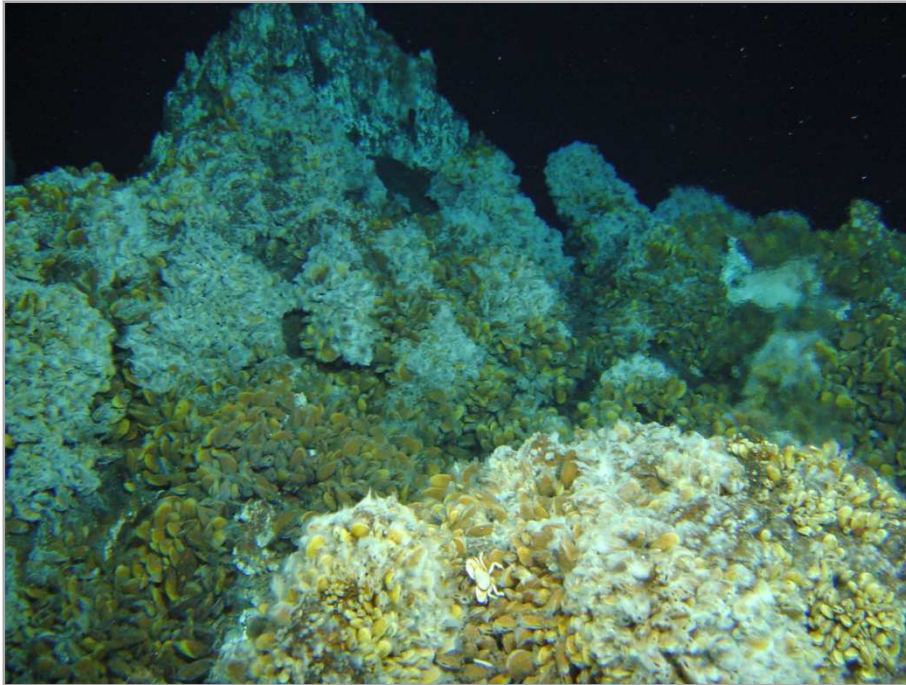


Planche II

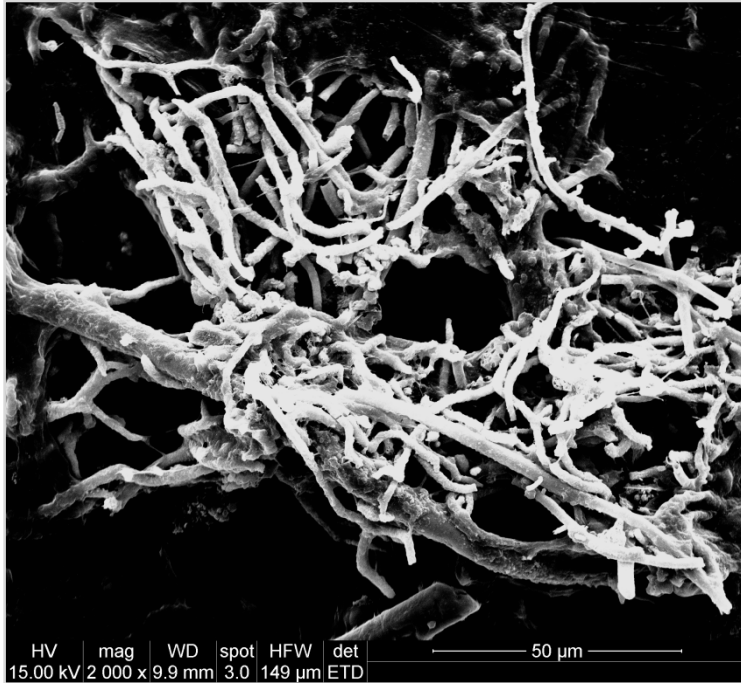
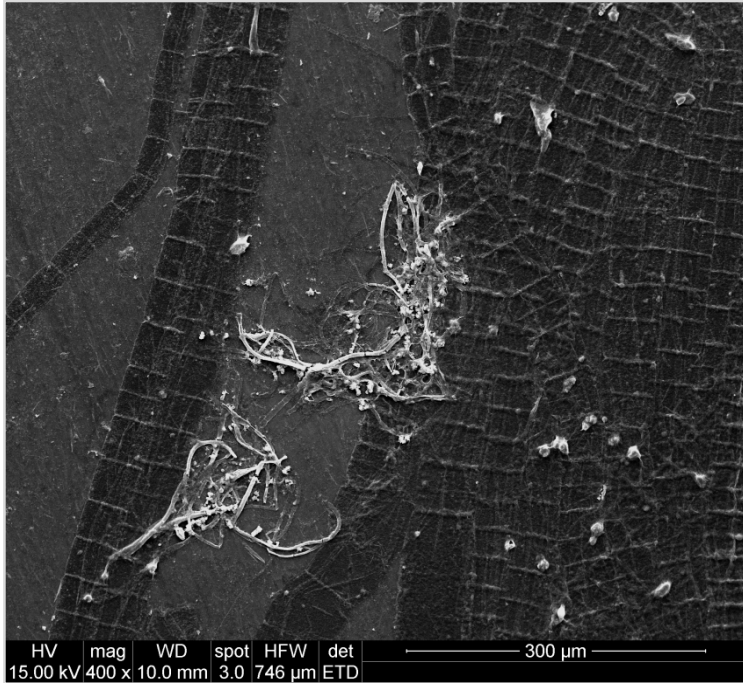
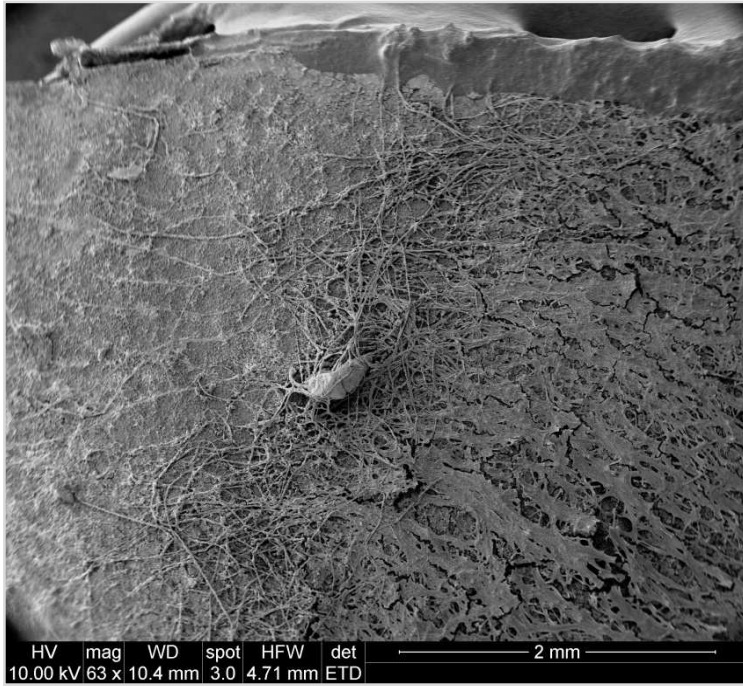
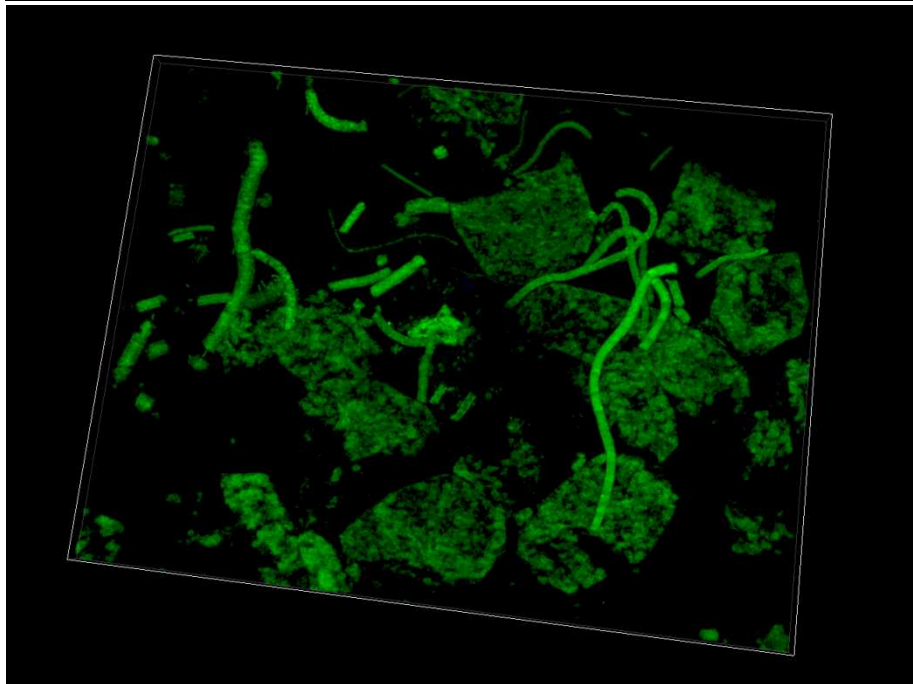
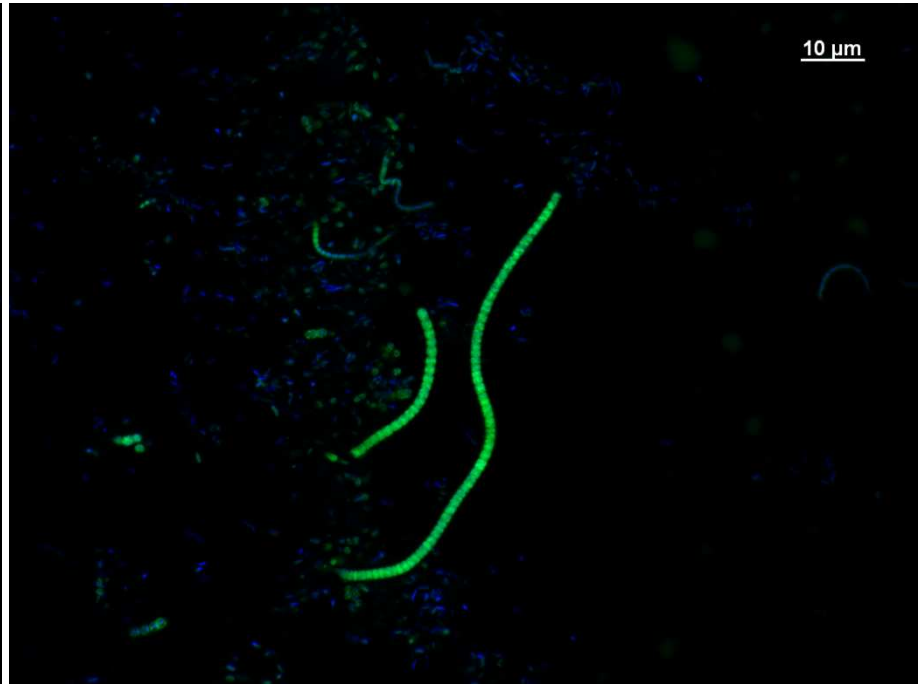
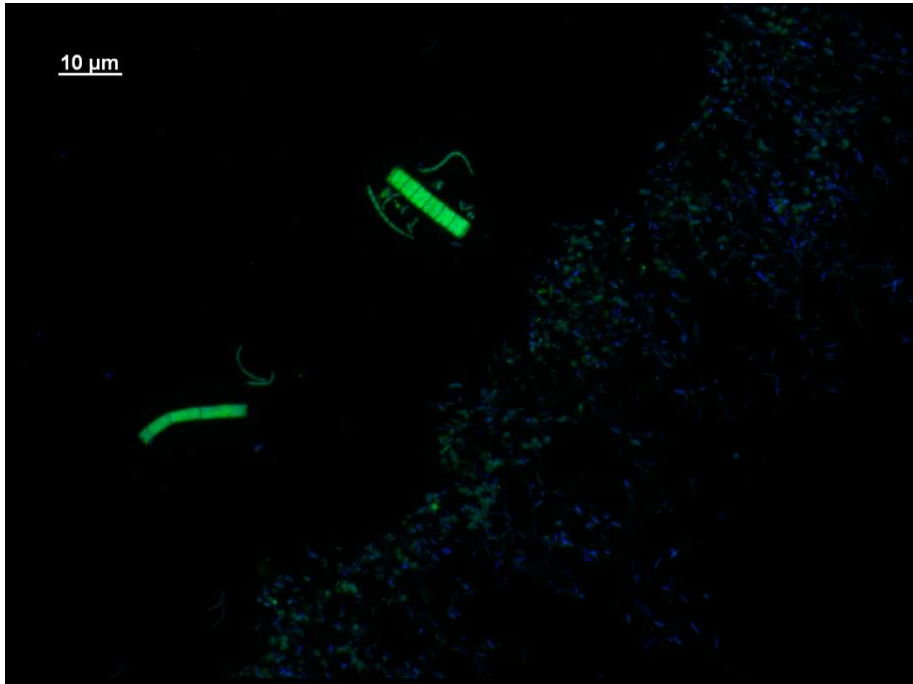


Planche III



3.2.2. Analyse par Q-PCR des communautés bactérienne et archéenne des tapis microbiens

Les tapis microbiens rassemblent des populations microbiennes complexes et diversifiées en termes de taille, de morphologie et de nombre de copies de gène par cellule ; il n'est donc pas possible de calculer un nombre moyen des cellules de chaque groupe. Le rapport entre la quantité d'ADN archéen (0,054 ng/ μ L) et d'ADN bactérien (136,75 ng/ μ L), soit un rapport de $1/2532$, permet toutefois de conclure à une nette dominance des populations bactériennes dans l'échantillon analysé et à une faible présence des archées (Tableau 7). Ce résultat confirme les observations effectuées en FISH (très peu d'archées sont présentes dans nos échantillons) et est cohérent avec les données de diversités observées dans les banques de clones obtenues pour ces deux populations.

Tableau 7. Bilan des Q-PCR réalisées.

Amorces	Groupe cible	Séquence (5'-3')	Référence	R²	slope	efficacité	intercept	[ADN] ng/μl
BACT1369F	<i>Bacteria</i>	CGGTGAATACGTTTCYCGG	(Suzuki et al., 2000)	0,996	-3,39	97,20%	18,73	136,75
BACT1492R		GGWTACCTTGTTACGACT						
ARC787F	<i>Archaea</i>	ATTAGATACCCSBGTTAGTCC	(Yu et al., 2005)	0,999	-3,66	87,60%	20,1	0,054
ARC1059R		GGWTACCTTGTTACGACTT						

3.2.3. Caractérisation de la population bactérienne du système digestif de *B. azoricus*

3.2.3.1. Méthode

Durant la campagne Bathyluck (2009), le système digestif de plusieurs modioles, ayant ou non subi une période de jeûne de cinq à six jours dans de l'eau de mer stérile, a été prélevé. Des extractions d'ADN totaux ont ensuite été pratiquées sur les appareils digestifs de quatre moules :

- Ba01-M2 : taille de 4,7 cm, pas de période de jeûne ;
- Ba01-M3 : taille de 2,7 cm ; pas de période de jeûne ;
- Ba01-M6 : taille de 5 cm, jeûne de 6 jours ;
- Ba01-M8 : taille de 3 cm, jeûne de 5 jours.

Quatre banques de 24 à 32 clones ont été réalisées avec les amorces universelles 8F/1492R ciblant le gène codant l'ARNr 16S des bactéries. Aucune banque de séquences d'archées n'a été construite car les PCR n'ont pas permis d'amplifier le gène d'intérêt.

3.2.3.2. Résultats et discussion

La diversité constatée dans les banques de clones était réduite : sept OTUs pour les moules n'ayant pas jeûné et deux ou trois OTUs pour les moules ayant subi une période de jeûne (Tableau 8). Les OTUs identifiés étaient presque tous présents dans les banques de clones construites lors des études de diversité sur les tapis microbiens (cf. 3.1.) ; seul le clone B.azo.gut-5 différait sensiblement : 95 % de similarité avec le clone le plus proche déjà obtenu. Ces OTUs étaient tous affiliés aux classes *Alpha* et *Gamma* des *Proteobacteria*, mais aucune séquence de *Thiotrichales* n'a été détectée. La présence de séquences affiliées aux symbiontes de *B. azoricus* était une constante dans les quatre banques de clones et ces séquences dominaient totalement, ou presque, chez les moules ayant subi un jeûne. La capacité de *B. azoricus* à digérer ses symbiontes en période de stress nutritif a déjà été attestée et peut expliquer ces résultats (Fisher, 1988; Kochevar et al., 1992; Kádár et al., 2005).

Tableau 8. Ensemble des clones bactériens identifiés dans l'appareil digestif des Moules (M) 2, 3, 6 et 8.

Clone	M2 ^a	M3 ^a	M6 ^a	M8 ^a	Équivalent ^b	Séquence de référence la plus proche	Affiliation	Accession	%
B.azo.gut-1	8	11	12	14	LS.mat.B42 et LS.meth.01	Endosymbionte méthanotrophe de <i>B. azoricus</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	AM083953	99
B.azo.gut-2	5	2	X	X	LSmat.B52	<i>Psychromonas hadalis</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	AB094413	97
B.azo.gut-3	1	3	X	X	LSmat.B51	<i>Colwellia psychrerythraea</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	AB011364	96
B.azo.gut-4	7	4	10	9	LS.mat.sulfo.02	Endosymbionte thiotrophe de <i>B. azoricus</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	AM083973	99
B.azo.gut-5	4	4	X	X	≈ LSmatB01 (95%)	<i>Phaeobacter</i> sp. <i>Roseobacter</i> sp.	<i>Alphaproteobacteria</i>	FJ436728 AY576690	97 96
B.azo.gut-6	3	2	X	X	LS.mat.B05	Clone de sédiments (système d'upwelling Namibien) <i>Ahrensia</i> sp.	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Alphaproteobacteria</i>	EU290708 GU575117	97 94
B.azo.gut-7	3	6	X	1	LSmatB01	Clone associé à <i>Riftia pachyptila</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	AF449223	98

^a nombre de clones pour chaque OTU observé dans la banque construite. Un X signifie que cet OTUs n'a pas été identifié dans la banque de clones.

^b indique le clone le plus proche retrouvé lors des études de diversité sur les tapis

3.2.4. Caractérisation de la diversité fongique

3.2.4.1. Introduction

Les communautés fongiques associées aux écosystèmes hydrothermaux marins profonds restent à ce jour peu étudiées. Les connaissances scientifiques sur la diversité et le rôle écologique de ces communautés dans ces habitats sont encore lacunaires. Si la découverte des sources hydrothermales marines profondes remonte à la fin des années 1970, ce n'est que récemment que les premiers indices d'une vie fongique ont été fournis par des approches moléculaires (Edgcomb et al., 2002; Lopez-Garcia et al., 2003; Bass et al., 2007; Van Dover et al., 2007) et seule une fraction des communautés fongiques détectées a été isolée (Gadanho and Sampaio, 2005; Burgaud et al., 2009; Burgaud et al., 2010). Ces approches culturales et moléculaires à partir d'échantillons océaniques hydrothermaux ont toutefois permis de mettre en évidence une diversité importante de champignons (champignons filamenteux et levures), comptant des espèces taxonomiquement originales et répartie dans trois phylums : (i) *Ascomycota*, (ii) *Basidiomycota* et (iii) *Chytridiomycota*. Seule l'approche moléculaire a permis de révéler la présence de champignons affiliés au phylum *Chytridiomycota*. Deux phylotypes taxonomiquement originaux de *Chytridiomycota* ont été détectés au niveau des tissus et à la surface de quelques modioles (*Bathymodiolus azoricus*) prélevées au niveau du site Lucky Strike (Le Calvez et al., 2009).

3.2.4.2. Méthode

Des extractions d'ADN ont été réalisées sur six échantillons provenant des campagnes océanographiques MoMARETO, MoMAR-08 et Bathyluck :

- MO23E01 : tapis sur dépôts hydrothermaux, Sud de Tour Eiffel ;
- MM03E02 : tapis sur flotteur en bois resté un an aux environs de Tour Eiffel ;
- MM04E01 : tapis sur moules au Sud de Tour Eiffel ;
- MM04E02 : tapis sur moules, prélevé avec le PEP et filtré ;
- Ba05E00 : tapis sur moules au Sud-est de Tour Eiffel ;
- Ba05E00b : tapis sur dépôts hydrothermaux au Sud-est de Tour Eiffel.

Des PCR directes avec les couples d'amorces ITS1F/ITS4 (Arenz et al., 2006) et EF4/EF3 (Smit et al., 1999) ont été réalisées sur ces extractions. Le couple ITS1F/ITS4 n'a pas donné de résultat, mais le couple EF4/EF3 a permis d'amplifier un fragment attendu d'environ 1,4 kb avec les extractions réalisées à partir des échantillons : MM04E01, MM04E02 et Ba05E00. Une PCR nichée a ensuite été réalisée à partir des premiers amplicons avec le couple d'amorces EF4/fung5 (Smit et al., 1999). Cette deuxième PCR a permis d'obtenir un fragment d'environ 550 pb sur les mêmes échantillons ayant répondu positivement avec le couple EF4/EF3.

3.2.4.3. Résultats et discussion

Au total quatre OTUs ont été identifiés (Figure 31) :

- Deux étaient éloignés de toutes souches isolées et n'appartiennent pas *stricto sensu* au groupe des champignons : BATHY2-EF4/EF3-02 appartenant au groupe des *Ichthyosporea* et BATHY1-EF4/EF3-03 appartenant au groupe des *Alveolata*.
- Un était affilié à un clone de champignon du genre *Iodophanus* détecté dans un intestin humain. Le genre *Iodophanus* appartient au phylum des *Ascomycota* qui compte seulement trois espèces décrites (*I. carneus*, *I. hyperboreus* et *I. testaceus*). Il est classiquement observé au niveau du sol, associé à de la matière organique en décomposition, mais a récemment été détecté au niveau de l'algue brune *Fucus serratus* (Zuccaro et al., 2007).
- Le dernier OTU, qui dominait les banques de clones, était affilié à un clone de champignons de l'ordre des *Chytridiales* précédemment détecté par approche moléculaire sur des échantillons de modioles prélevées sur le site de Lucky Strike (Le Calvez et al., 2009). Les *Chytridiales* sont considérés comme formant la lignée évolutive la plus ancienne du règne des champignons et sont le plus souvent des parasites obligatoires (plantes ou animaux).

Les rôles écologiques des champignons dans les écosystèmes hydrothermaux marins profonds sont encore peu connus. À ce jour, seules des levures noires de l'ordre des *Chaetothyriales* (*Ascomycota*) détectées par approches moléculaire (Van Dover et al., 2007) et culturale (Burgaud et al., 2009) ont été associées à des phénomènes de mortalité massive

de modioles hydrothermales et auraient donc vraisemblablement un rôle de parasites facultatifs ou de pathogènes opportunistes. Une analyse métagénomique, réalisée à partir d'échantillons prélevés par grattage de la face externe d'une coquille de *B. azoricus* du site de Lucky Strike, a permis de révéler des voies métaboliques d'un organisme affilié aux *Chytridiomycota*. Cette analyse a permis de rejeter l'hypothèse d'un mode de vie parasitaire pour cette espèce en raison d'une indépendance vis-à-vis de l'apport de composés soufrés d'origine organique. Elle a également permis de détecter des interactions entre procaryotes et champignons : des enzymes fongiques impliquées dans la production de molécules antibiotiques (pénicilline) ont en effet été identifiées (Le Calvez, 2009).

Nos résultats, qui mettent en évidence la coexistence de tapis microbiens et de champignons à la surface des modioles, suggèrent que les micro-organismes procaryotes disposent de moyens de défense contre ces antibiotiques – l'organisation en tapis pourrait constituer un avantage dans la résistance aux agents antimicrobiens produits (cf. 1.5.2.) – et/ou que les champignons sont fortement minoritaires en termes de biomasse. Les champignons pourraient également intervenir dans le cycle du méthane en métabolisant le méthanol et dans le cycle du soufre en incorporant des molécules d' H_2S au sein d'acides aminés (une cysteine synthase a été détectée) (Le Calvez, 2009). Leur capacité à dégrader des molécules complexes pourrait enfin les mettre en concurrence avec les bactéries du groupe *Bacteroidetes*, abondantes dans les tapis microbiens étudiés. L'absence de champignons dans les échantillons de tapis recouvrant d'autres substrats que les moules semble toutefois exclure une relation directe entre tapis et champignons.

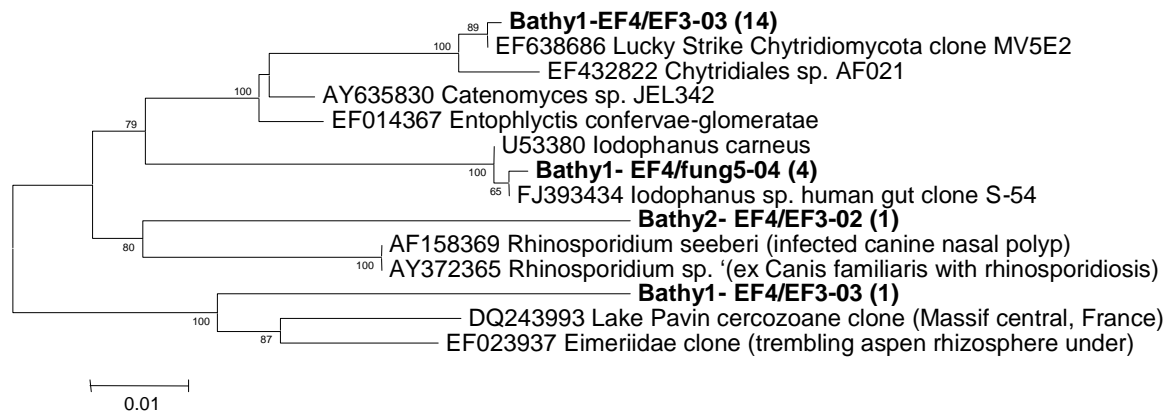


Figure 32. Arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant l'ARNr 18S fongique. L'analyse a été réalisée par la méthode du Neighbor Joining avec la correction de Kimura. Le nombre de clones pour chaque OTU est indiqué entre parenthèse.

3.3. Suivi moléculaire d'une culture de micro-organismes sulfo-oxydants en fermenteur

Depuis une quinzaine d'années, des inventaires moléculaires, basés pour la plupart sur l'étude des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S, ont été réalisés pour décrire la diversité microbienne associée aux écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds. Ces études ont été menées sur une variété d'échantillons hydrothermaux provenant de différents sites géographiques : faune, tapis microbiens, collecteurs *in situ*, sédiments, fluides et édifices hydrothermaux actifs ou non.

L'essor de ces approches moléculaires a ainsi permis la détection de nombreuses espèces incultivées dont le métabolisme et le rôle dans leur écosystème restent souvent obscurs. L'existence de biais liés à ces techniques (Waits and Leberg, 2000; Prosser, 2002; Dorigo et al., 2005) et la profusion de résultats qu'elles permettent d'obtenir rendent souvent l'interprétation de ces derniers difficile. D'autre part, les techniques de culture classiques, souvent sélectives, ne donnent pas une image exacte de la composition des communautés. Pour comprendre l'importance écologique et la structure des communautés formées par ces micro-organismes incultivés, un effort doit être fait pour améliorer les approches culturelles et les relier à des méthodes moléculaires d'investigation. Le développement de systèmes de culture en fermenteur permet de se rapprocher des conditions environnementales et de suivre dans le temps le développement de communautés microbiennes plutôt que de souches pures (Palleroni, 1997).

Dans cet article, nous décrivons l'utilisation d'un fermenteur gas-lift de 2 litres pour la réalisation d'une culture d'enrichissement (85 jours) en conditions contrôlées. Le fermenteur gas-lift a précédemment été mis au point pour la culture de micro-organismes hyperthermophiles anaérobies sulfato-réducteurs (Raven et al., 1992b) et utilisé pour la réalisation de cultures de communautés microbiennes hyperthermophiles issues des édifices hydrothermaux actifs (Postec et 2005, Postec et al 2007, Byrne et al 2009). Il a ici été adapté pour la culture des populations microbiennes sulfo-oxydantes des tapis microbiens de Lucky Strike : la température a ainsi été maintenue à 8°C et le système a été alimenté en H₂S, en O₂ et en carbone inorganique, afin de créer un environnement favorable aux micro-organismes lithoautotrophes oxydant les composés soufrés. Pour permettre la fixation des bactéries

filamenteuses et favoriser la formation de tapis microbiens, ainsi que pour se rapprocher des conditions naturelles (système dynamique), des substrats inertes (billes de verres et pierres ponce artificielles) ont été placés dans la cuve et un flux gazeux constant a été établi.

La dynamique et la diversité de la communauté microbienne enrichie ont été suivies et analysées en utilisant des approches moléculaires. Des extractions d'ADN et d'ARN ont été réalisées sur des échantillons prélevés à différents temps de la culture et des amorces spécifiques ont été utilisées pour amplifier (en PCR et RT-PCR) le gène codant l'ARN ribosomal 16S ainsi que des gènes de fonction impliqués dans la fixation autotrophe du carbone : forme 1 et 2 RuBisCO (*cbbL/M*), ATP-citrate lyase B (*acIB*) et l'oxydation des composés soufrés : *aprA* et *soxB*. Des hybridations fluorescentes *in situ* ont également été réalisées.

Ces travaux nous ont permis d'observer une communauté active diversifiée, composée de micro-organismes hétérotrophes et sulfo-oxydants, dont la structure a varié au cours du temps, aussi bien en termes de biomasse que d'espèces actives. Aucun développement de bactéries filamenteuses n'a été observée, mais une population d'*Epsilonproteobacteria* potentiellement lithoautotrophe et non identifiée lors de l'approche moléculaire sur échantillons environnementaux (cf. 3.1.) a été enrichie.

Les résultats obtenus feront l'objet d'un article qui sera soumis au journal « Current microbiology ». Une première version de cet article est présentée ci-après.

1 Exploring sulfur-oxidizers diversity from Lucky 2 Strike microbial mats using enrichment culture 3 in bioreactor

4 Crépeau Valentin¹, Lesongeur Françoise¹ and Godfroy Anne¹

5 ¹UMR 6197, IFREMER-CNRS-UBO, Laboratoire de Microbiologie des
6 Environnements Extrêmes, BP70, 29280 Plouzané, France.

7 Summary

8 We describe here the use of a 2 liter gas-lift bioreactor, inoculated with previously
9 characterized microbial mat samples from the Lucky Strike (LS) hydrothermal area
10 (Crepeau, 2010), to perform a long time enrichment culture under controlled
11 conditions. By maintaining cold conditions (8°C) and supplying the system with
12 hydrogen sulfur, oxygen and inorganic carbon, we attempted to create a favorable
13 environment for the growth of autotrophic sulfur-oxidizing microorganisms. The
14 dynamic and the microbial diversity of the cultivated community were monitored using
15 molecular approaches. DNA and RNA were extracted from the culture at different
16 time. Domain-specific polymerase chain reaction primers were used to amplify (in
17 PCR and RT-PCR) 16S ribosomal RNA gene and functional genes involved in
18 autotrophic carbon fixation: form 1 and 2 RuBisCO (*cbbL/M*), ATP-citrate lyase B
19 (*acIB*) and sulfur oxidation: adenosine-5'-phosphosulfate (*aprA*) and SoxB
20 component of the periplasmic thiosulfate-oxidizing Sox enzyme complex (*soxB*).

21 The 16S rRNA gene sequence analysis revealed a dynamic community dominated
22 by heterotroph populations and *Epsilonproteobacteria*. Whole cells hybridizations
23 confirmed the enrichment and the increase of *Epsilonproteobacteria* populations over
24 time. The functional gene banks of transcripts showed diversities of active autotroph
25 and lithotroph populations with the presence of microorganisms using the ATP-citrate

26 lyase pathways to assimilate carbon and *aprA* or *soxB* pathways to oxidize sulfur
27 compounds.

28 We confirmed here that enrichment culture combined to molecular survey is an
29 interesting way to apprehend specific community and revealed metabolic
30 potentialities from complex environmental samples.

31 **Introduction**

32 The use of 16S rRNA and functional genes based molecular inventory, revealed
33 extensive microbial phylogenetic and metabolic diversities in many different
34 ecosystems. Within deep-sea hydrothermal environments, diversity and function of
35 microbial communities associated with in situ colonizers (McCliment et al., 2006),
36 fauna (DeChaine and Cavanaugh, 2005; Duperron et al., 2006; Durand et al., 2010),
37 sediments (Kormas et al., 2003; Inagaki et al., 2006; Kormas et al., 2008), chimneys
38 (Takai et al., 2001; Suzuki et al., 2004; Takai et al., 2007) and microbial mats (Moyer
39 et al., 1994; Teske et al., 2002; Kato et al., 2009; Rassa et al., 2009; Crepeau, 2010;
40 Gerasimchuk et al., 2010; Grunke et al., 2010) have been reported in recent
41 molecular surveys. The rise of molecular microbial ecology resulted in the detection
42 of many uncultivated microorganisms which metabolism or role in the environment
43 could not always be known. Also, biases (Waits and Leberg, 2000; Prosser, 2002;
44 Dorigo et al., 2005) and profusion of results linked to the use of molecular
45 approaches often make interpretations difficult. To understand the ecological
46 significance and community structure formed by these uncultivated microorganisms,
47 an effort has to be made to improve cultural approaches and link them to molecular
48 studies.

49 Traditional culture attempts from hydrothermal samples were usually performed by
50 enrichment cultures in flasks (Nelson and Jannasch, 1983; L'Haridon et al., 2006;
51 Takai et al., 2006; Hirayama et al., 2007). Even complex prokaryotic associations like
52 microbial mats have been seldom studied by different cultural methods. An approach
53 in bioreactor inoculated with mats from the Pacific hydrothermal vent site 9N and
54 Guaymas Basin has nevertheless to be considered (Taylor et al., 1999; Wirsén et al.,
55 2002). This work has permitted to isolate the specie "*Candidatus Arcobacter*

56 *sulfidicus*" which mainly composed these mats. Enrichment culture in bioreactor was
57 expected to allow the growth of microorganisms poorly represented in the ecosystem,
58 exhibiting a long latency phase, needing others species for developing or simply
59 having not previously been cultivated so far. This could be induced by substrate
60 supply, culture medium renewal, pH regulation and long incubation time. Moreover,
61 microbial community dynamic in bioreactor can be monitored looking 16S rRNA and
62 16S rDNA sequences (Delbès et al., 2001; Postec et al., 2007; Byrne et al., 2009). All
63 these factors made the enrichment cultures in bioreactor an interesting way to
64 apprehend specific community from complex environmental samples, like microbial
65 mats from the Lucky Strike (LS) hydrothermal vent field, on Mid-Atlantic ridge (MAR).
66 Previous work showed that theses mats host a great bacterial diversity, despite being
67 dominated, in terms of biomass and activity, by a large sulfur-oxidizing filamentous
68 bacterium affiliated to *Beggiatoa* (Crepeau, 2010). Microorganisms with
69 chemolithoautotrophic metabolism represent an important and active part of this
70 diversity and a prevalence of sulfur-oxidizers among microbial populations was
71 observed.

72 In this paper, we describe the use of a 2 liter gas-lift bioreactor to perform a long time
73 enrichment culture (85 days) under controlled conditions. The gas-lift equipment was
74 previously developed to grow anaerobic hyperthermophilic microorganisms (Raven et
75 al., 1992) and was adapted here it to grow the non-thermophilic species occurring in
76 the LS mats: maintaining cold conditions (8°C) and supplying the system with
77 hydrogen sulfur, oxygen and inorganic carbon, we attempted to create a favorable
78 environment for sulfur-oxidizing microorganisms. Agitation and substratum were also
79 provided to promote the mat formation.

80 The dynamic and the microbial diversity of the communities enriched in bioreactor
81 were analyzed using molecular approaches. Both DNA and RNA were extracted from
82 the enrichment culture at different time. Domain-specific polymerase chain reaction
83 universal primers were used to amplify (in PCR and RT-PCR) 16S ribosomal RNA
84 gene and functional genes encoding enzymes involved in autotrophic carbon fixation
85 (*cbbL*, *cbbM* and *acIB*) and sulfur oxidation (*aprA* and *soxB*). Whole cells
86 hybridizations were equally performed.

87 **Material and method**

88 *Sampling site and procedure*

89 The LS vent field (1700 m depth) is located at 31°17'N, 32°16'W on the MAR.
90 Microbial mats filaments covering *B. azoricus* assemblages and hydrothermal
91 deposits were sampled on the East and South sides of the Tour Eiffel edifice during
92 the French cruise Bathyluck (2009). Samples were retrieved on mussel assemblages
93 1 and 2b as defined by Cuvelier (Cuvelier et al., 2009). They were collected by
94 scraping mussel shells brought to the surface into beforehand decontaminated boxes
95 or using the water pumping device of the ROV Victor 000 Before dive the water
96 pumping device tubes was washed twice with Desibac HPS™ (7 d'Armor), rinsed
97 with sterile water, then with alcohol and finally filled with sterile sea water.

98 *Continuous enrichment culture in a gas-lift bioreactor*

99 The growth medium was the MJ synthetic seawater (Hirayama et al., 2007)
100 supplemented with (per liter): 1mL Balch's vitamin mixture; 10mL of 5mM
101 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution ; 1mL of 3mM $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
102 solution ; 1 mL of 3 mM $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution. All the solutions were autoclaved
103 separately except the vitamins solution which was sterilized by filtration (0.2 μm).

104 *Culture conditions*

105 The culture was performed in dark with a 2 L glass gas-lift bioreactor (Raven et al.,
106 1992; Godfroy et al., 2006) (Fig. 1). During all the culture (85 days) the temperature
107 was maintained at 8°C and the pH at 7.1. The culture started on the *Pourquoi Pas ?*
108 shipboard during the French cruise Bathyluck (2009). After 33 days (T33), all the
109 system was transferred in our laboratory (LMEE, Ifremer Brest, FRANCE). The
110 transfer took less than a couple of hours and only a temperature increase of 2.6°C
111 was noticed. Nevertheless, due to the transport, the cooler circulated bath failed
112 during one night (T33-34) resulting in a temperature increase up to 20.4°C before the
113 system being repaired.

114 Temperature and pH were controlled by an analogical controller (Infors, France)
115 connected to a pH transmitter associated to a gel pH electrode (Mettler Toledo) and a
116 PTFE-covered PT100 temperature probe associated to a temperature controlled
117 cooler circulated bath (Julabo) filled with water. Acid (1 N HCl) and base (1 M
118 Na₂CO₃) were added using peristaltic pumps (Masterflex).

119 The bioreactor was inoculated with 30 mL of medium containing 3 g of microbial
120 mats. After 20 days (T21), the sample was inoculated again with a 5 g mat
121 suspension. This second inoculation step was performed in the absence of obvious
122 filamentous bacteria development.

123 Fresh medium feeding and product draw-off were performed each day using manual
124 pumps. First (T2-T3) 50 mL of sampling and medium addition was done per day.
125 Then, due to very high cell density, sampling and medium renewal was increased to
126 100 mL.day⁻¹ during the T4-T25 period and to 200 mL during the T26-T85 period.

127 The culture was continuously and gently flushed with N₂ (50 mL.min⁻¹) during the
128 culture on shipboard. After the bioreactor transfer (T33) from the *Pourquoi Pas ?* to
129 the laboratory, the culture was flushed with N₂/CO₂ (95/5) to supply the culture with
130 inorganic carbon (Camp and Sublette, 1992). During cultivation on shipboard the
131 medium was supplied with inorganic carbon using NaHCO₃ (6 mM).

132 To supply the culture in H₂S , N₂ or N₂/CO₂ flow was carried out through a bottle
133 containing 100 mL of 0.1-0.4 % (w/vol) Na₂S solution (Wirsen et al., 2002)
134 (cf. experimental scheme) allowing H₂S to be carried away from the Na₂S solution to
135 the culture medium. The Na₂S solution was replaced each day and its concentration
136 was adapted (0.1 to 0.4 %) to the presence or not of Na₂S in the medium. This
137 presence was checked each days (before replacing the Na₂S solution) using lead
138 acetate strips (Whatman[®]).

139 To allow filamentous bacteria to adhere and form biofilms, glass beads and artificial
140 pumice were provide in the tank, as substrata.

141 *Culture monitoring and sample preservation*

142 Cell concentration was determined by direct cell counting on liquid cultures samples
143 using a Thoma chamber (0.02 mm depth) viewed with an Olympus BX60 phase
144 contrast microscope (X400 magnification).

145 Culture samples from the bioreactor were collected every 24h, from T4 (day 4) to T85
146 (day 85). For DNA or RNA extraction, cells were recovered from 15 ml of culture by
147 centrifugation (20 min at 8,000-g). Cell pellets were then resuspended in 5 ml of lysis
148 buffer TE-Na 1·(Tris-HCl pH 8, 100 mM ; NaCl 100 mM, EDTA pH 8, 50 mM), and
149 stored at -80°C until extraction. For culture, samples (15 mL) were stored at -80°C in
150 the presence of a cryoprotectant (dimethyl sulfoxide: DMSO, 5%).

151 *DNA extraction and PCR amplification*

152 Total DNA was extracted using FastDNA® Spin kit for soil (Qbiogene, Inc, CA) with
153 protocol as modified by Webster and Roussel (Webster et al., 2003; Roussel et al.,
154 2009).

155 Presence of sulfur-oxidizers was investigated using two couples of primers:
156 APS1F/APS4R and Sox432F/Sox1446R, specific of adenosine 5'phospho-sulfate
157 reductase α -sub-unit gene and *soxB* genes respectively. To investigate autotrophic
158 carbon fixation, both forms 1 and 2 of RuBISCO genes were amplified using
159 respectively *cbbLF/cbbLR* and *cbbMF/cbbMR/cbbMR* primer combinations. Also,
160 ATP-citrate lyase β sub-unit gene was amplified using the *ac/B892F/ac/BR* primers.

161 The bulk DNA was amplified in a 25 μ L reaction mix containing: 5 μ L of 5X GoTaq®
162 Flexi DNA polymerase buffer (Promega), 1.5 μ L of 25 mM MgCl₂ solution, 0.2 μ L of
163 10mM dNTPs solution, 0.1 μ L of each primer at 100 pM and 0.12 μ L of 5U. μ L⁻¹
164 GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega). PCR conditions were the same as
165 indicated in reference publications for each couple of primers (all primers used for the
166 study are summed in Table 3 supplementary data).

167 *RNA extraction and RT-PCR amplification*

168 Total RNA was extracted using the FastRNA® Pro soil direct kit (Qbiogene, Inc, CA)
169 according to the manufacturer's instructions. To digest trace amounts of DNA, the
170 extraction products were incubated 1 h at 37°C with 1X TURBO DNase® buffer and
171 18U of TURBO DNase® (Ambion™). The digestion was stopped by adding EDTA to
172 a final concentration of 15 mM and heated 10 min at 65°C before the purification step
173 using the RNeasy minikit (Qiagen™) following the manufacturer's instructions. The
174 absence of DNA was tested by direct PCR assay which were all negative. RNA
175 reverse transcription followed by DNA amplification, were performed using the
176 OneStep RT-PCR kit (Qiagen™).

177 Amplification of function genes was performed using the same primers set as for
178 PCR amplification. Amplification of 16S rRNA genes was performed using the
179 universal primers for *Bacteria* and *Archaea*: U1492R as reverse primer and E8f for
180 *Bacteria* or A8f for *Archaea* as forward primer.

181 PCR conditions were the same as indicated in reference publications for each couple
182 of primers, except the addition of a reverse-transcription step (30 min at 50°C) and
183 an initial PCR activation step at 95°C for 15 min before the standard cycles.

184 *Clone library construction and sequencing*

185 Before cloning, all PCR products were purified using the Qiaquick® Gel Extraction Kit
186 (Quiagen) according to the manufacturer's instructions. Clone libraries were
187 constructed by transforming *E. coli* TOP10F' using the TOPO XL Cloning kit
188 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Plasmid extraction,
189 purification and sequencing were carried out by GATC Biotech, (Konstanz,
190 Germany).

191 *Nucleotide sequence accession numbers*

192 For each OTU, one sequence was deposited in the GenBank database under
193 accession numbers (in progress).

194 *Whole-cell hybridization*

195 A 10 mL samples was fixed by adding formaldehyde at 3 % final concentration. After
196 3 h, samples were centrifuged (30 min, 8000g) and the pellets were resuspended in
197 800 μ L PBS/ethanol 50% (v/v). Drops of fixed cells were settled on Superfrost® Plus
198 slides (Roth, Germany). After drying at room temperature, whole cell hybridization
199 was performed using four FISH probes, eub338, arch915, gam42a and epsi549.
200 These probes target respectively the *Bacteria*, the *Archaea*, the
201 *Gammaproteobacteria* and the *Epsilonproteobacteria* groups (Table 4 supplementary
202 data for sequences). Samples were hybridized using 100 ng of a given probe in
203 30 μ L hybridization buffer (0.9 M NaCl, 0.02 M Tris/HCl pH 8.0, 0.01% SDS, 30-45%
204 formamide) for 3 h at 46°C in pre-heated chambers saturated with hybridization
205 buffer. After hybridization, slides were washed for 15 min at 48°C with buffer (0.1 M
206 NaCl, 0.02 M Tris/HCl pH 8.0, 0.01 % SDS, 5 mM EDTA), air dried, and mounted in
207 antifade reagent (SlowFade® Gold, Invitrogen) containing 4',6'-diamidino-2-
208 phenylindole (DAPI). Hybridized cells were examined using a Zeiss Imager Z.2
209 microscope.

210 **Results**

211 *Monitoring the enrichment culture in bioreactor*

212 The bioreactor was inoculated with 3 g of microbial mat in suspension in 30 mL of
213 medium. High cell densities were measured immediately after inoculation (Fig. 2).
214 The density has risen up to $9.3 \cdot 10^8$ cell.mL⁻¹ during 4 days and then decreased until
215 the second inoculation (Fig. 2). After the second inoculation the cell density raised
216 again up to $8.5 \cdot 10^8$ cell.mL⁻¹ and then decreased. From T49 slower density decay
217 was observed and the cell density stabilized around $5 \cdot 10^7$ cells.mL⁻¹ after T71.
218 Amongst observed morphologies, rod-shaped were dominant throughout the
219 enrichment culture but coccoid cells, single or in pairs, were also observed. No
220 filamentous shaped microorganisms were or viewed. FISH observation revealed the
221 absence of *archaea* at any time, the dominance of *Gammaproteobacteria*, especially

222 after inoculations, and a progressive raise of *Epsilonproteobacteria* over time (Fig. 3
223 supplementary data).

224 *Active microbial population revealed by 16S rRNA specific primers*

225 Twelve transcript libraries were built by RT-PCR using 16S rRNA gene bacterial
226 primers on RNA extracted from samples at T4, T8, T12, T16, T21, T31, T38, T44,
227 T49, T60, T71 and T85. Each library contains between 16 and 24 clones except the
228 T4 which has 40. Twenty different OTUs (defined at 97% similarity threshold) were
229 identified in these transcript libraries and important changes in active bacterial
230 representatives were observed over time (Fig.2 and Table 1). No transcript library
231 was built for *archaea* because amplification of archaeal 16SrRNA in RT-PCR was
232 unsuccessful.

233 Two OTUs affiliated to *Alphaproteobacteria* were identified. Both belong to
234 *Rhizobiales* order and were related to an uncultured clone from oil reservoir and to
235 the species *Terasakiella pusilla* (Satomi et al., 2002). Within *Gammaproteobacteria*,
236 the *Alteromonadales* order was the most represented in our libraries (4 OTUs over
237 time), but active *Oceanospirillales* and *Vibrionales* were also identified. We also
238 observed, at T12 and T16, an OTU closely affiliated to a symbiont of a worm
239 associated with whale-fall, *Osedax mucofloris* (Verna et al., 2010). The *Bacteroidetes*
240 group had 4 representatives in the libraries. Two of them belong to the
241 *Flavobacteriales*: one was affiliated to *Tenacibaculum discolor* and the other to
242 *Vitellibacter vladivostokensis*. Within *Epsilonproteobacteria*, six OTUs were identified.
243 They were affiliated to *Arcobacter* sp. clones (*Campylobacteriales* order) and with
244 uncultured clones from various environments: East Lau Spreading Center, Yellow
245 Sea, Arctic sediment, North Sea oil field and marine fish hatchery in Vancouver
246 Island. Only one of the six OTU was retrieved in the molecular inventory previously
247 performed on environmental mat samples (Crepeau, 2010). Two others OTUs
248 belonged to *Bacteroidetes* and were affiliated to uncultured clone from shallow
249 hydrothermal vents mats and with clone associated to the urchin *Strongylocentrotus*
250 *intermedius*.

251 *Sulfo-oxidizing activity*

252 Ten libraries (7 to 9 clones) were built using the APS1F/APS4R on RNA extracted
253 from samples at T12, T16, T21, T31, T38, T44, T49, T60, T71 and T85. Six libraries
254 (7 to 9 clones) were built using the Sox432F/Sox1446R on RNA extracted from
255 samples at T12, T31, T38, T60, T71 and T85. Two libraries were also built by direct
256 PCR (42 to 50 clones) using the same primers on DNA extracted on a sample at T4.

257 In the *aprA* transcript library four OTUs were identified (Table 2). They were related
258 to clones from *Asterechinus elegans* gut, an *Echinodermata* associated with wood-
259 falls (Becker et al., 2009) and to clones associated with cold seep vestimentiferan or
260 *Candidatus Ruthia magnifica*. Eight others OTUs were detected in the *aprA* library
261 built by direct PCR (Table 5 supplementary data). They were mostly affiliated to
262 *Gammaproteobacteria* related to symbionts of tubeworms like *Oligobrachia*
263 *haakonmosbiensis* from Håkon Mosby mud volcano (Lösekann et al., 2008) and
264 symbiont of *Asterechinus elegans* and *Kiwa hirsuta*, a galatheid collected from
265 hydrothermal vents in the Pacific-Antarctic Ridge (Goffredi et al., 2008).

266 Only one OTU was identified in the *soxB* transcript library (Table 2). It was related to
267 the *Allochromatium vinosum soxB* gene, an anoxygenic purple sulfur *Chromatiaceae*.
268 Six others OTUs were only observed in the *soxB* library built by direct PCR (Table 5
269 supplementary data). These sequences were affiliated to *Alphaproteobacteria*,
270 *Gammaproteobacteria* and *Epsilonproteobacteria* uncultured clones from oceanic
271 hydrothermal ecosystems.

272 *Autotrophic carbon fixation*

273 RT-PCR using *cbbLF/cbbLR* and *cbbLF/cbbMR* primers set was unsuccessful, but
274 the *acIBF/acIBR* couple allowed to build 11 libraries (8 to 10 clones) on RNA
275 extracted from samples at T8, T12, T16, T21, T31, T38, T44, T49, T60, T71 and T85.
276 Also three libraries (30 to 44 clones) were built by direct PCR using the same three
277 sets of primers on DNA extracted from the T4 sample.

278 All the *acIB* gene transcript sequences (Table 2) were affiliated to
279 *Epsilonproteobacteria*, including *Arcobacter* genus relatives (Campbell et al., 2003;

280 Takai et al., 2005) and clones from mussel patch in the Logatchev hydrothermal area
281 (Hügler et al., 2010). In the *aciB* library built by direct PCR (Table 6 supplementary
282 data) *Sulfurimonas* genus and *Kiwa hirsuta* epibiont (Goffredi et al., 2008) relative
283 sequences were retrieved.

284 OTUs identified in *cbbL* library built by direct PCR were related to a *Lucinoma aff.*
285 *kazani* endosymbiont (Duperron et al., 2007) and to *Solemya velum* gill sulfur-
286 oxidizing symbionts (Schwedock et al., 2004). In the *cbbM* library, the retrieved
287 sequences were related to various *Lamellibrachia* symbionts (Elsaied and
288 Naganuma, 2001; Lösekann et al., 2008), to the *Epsilonproteobacteria* symbiont of
289 *Ridgeia piscesae* and to the nitrogen fixing *Alphaproteobacteria Rhodobacter*
290 *capsulatus* (Larimer et al., 1995) (Table 6 supplementary data).

291 **Discussion**

292 *Dynamic of the cultured microbial community*

293 Both cell count and FISH observations revealed a dynamics over time in the culture.
294 Filamentous *bacteria* might have supplied our culture medium with organic matter
295 and might have permitted growth of saprophyte species. This could explain the
296 increase of cell density during the few days after inoculations. Progressive depletion
297 in organic carbon, due to consumption and medium renewal, had led to a decrease in
298 cell density after this few days. The increase of temperature due to the cooler-bath
299 failure at T33 and the dilution rate increase after T25 may explain the rapid fall of cell
300 density observed after the second inoculation.

301 Progressive raise of *Epsilonproteobacteria* as revealed by FISH observations could
302 reflect the slow growth of these potential lithoautotrophic micro-organisms and their
303 selection over time in a medium designed for sulfo-oxidizers. The raise of
304 temperature at T33 did not seem to affect this *Epsilonproteobacteria* population, and
305 is consistent with the ability of these species to deal with temperature variations in
306 hydrothermal area.

307 *Evidence of heterotrophy in the bioreactor*

308 OTUs related to heterotrophs species were observed in all 16S rRNA transcript
309 libraries; however, a progressive decrease of their diversity was observed. OTUs
310 affiliated to the heterotrophic *Gammaproteobacteria: Vibrionales, Oceanospirillales*
311 and *Alteromonadales* orders were highly present in the libraries, but also
312 heterotrophic species belonging to *Alphaproteobacteria* and *Bacteroidetes* were
313 detected. Nevertheless, several sequences affiliated to *Alphaproteobacteria* and
314 *Bacteroidetes* were observed as being active a few days after inoculations but could
315 not maintain, suggesting a competition between species and the dominance of
316 *Gammaproteobacteria* heterotrophic species, which has been confirmed by FISH
317 observations. Compare to the heterotroph community diversity in LS mat
318 environmental samples, the one detected in bioreactor appear quite limited, with a
319 low presence of *Bacteroidetes*. This group contains various species able to degrade
320 organic molecules and is usually well represented in rich organic material systems
321 like mats (Kirchman, 2002; Stevens et al., 2005; Crepeau, 2010).

322 *Evidence of sulfur-oxidization in the bioreactor*

323 Several recent molecular studies have shown the presence and the dominance of the
324 *Epsilonproteobacteria* as free-living organisms and in association with metazoans or
325 within biofilms at deep-sea hydrothermal vents (Corre et al., 2001; Campbell et al.,
326 2006; Zbinden et al., 2008). Hydrothermal vent diffuse flow sites, which are areas of
327 mixing between hydrothermal fluids and ambient seawater, provide an ideal habitat
328 for members of this subdivision which contains many sulfur-oxidizing species (Corre
329 et al., 2001; Inagaki et al., 2004; Campbell et al., 2006; Takai et al., 2006). Quite low
330 but constant level of sulfides (0.8-2 μM) and presence of oxygen (230-240 μM)
331 (Sarradin et al., 2009; Cuvelier et al., in press) make the LS mats a good habitat for
332 sulfo-oxidizers communities in which *Epsilonproteobacteria* are significant
333 contributors (Crepeau, 2010).

334 The culture in bioreactor, supplied in H_2S and O_2 , tried to mimic this favorable
335 environment. The analysis of 16S rRNA libraries showed the growth of an active
336 *Epsilonproteobacteria* community and the presence of representatives of this group

337 in the rTCA gene libraries. This confirm active carbon fixation by *Campylobacterales*
338 related organism and also by a Logatchev clone related one (Hügler et al., 2010).
339 Despite these results, neither sequence among the *aprA* nor *soxB* transcript clone
340 libraries seems to match within *Epsilonproteobacteria*. This might indicate PCR
341 biases, lack in gene bank, wrong affiliation of deposited sequences, or simply that
342 part of our sequences that exhibit quite far relationship from other clones could
343 belong to *Epsilonproteobacteria*. Two sequences related to this group were
344 nevertheless detected in the *soxB* library built in direct PCR with DNA extracted on
345 sample T4.

346 No *acIB* transcript sequences were identified at T4 and no *aprA* nor *soxB* transcript
347 sequences were identified before T12, confirming the slower growth of
348 lithoautotrophic micro-organisms in comparison with organoheterotrophic ones.

349 *Insight into chemoautotroph diversity of LS mats using enrichment culture coupled to*
350 *molecular studies*

351 Autotrophic microorganisms were enriched in co-culture with heterotrophs, permitting
352 to have an insight on microbial metabolism inside a community rather than
353 extrapolated from pure cultures (Tor et al., 2003). The microorganisms identified in
354 this study displayed a phylogenetic and a metabolic diversity. Most of them were not
355 retrieved during the molecular characterization of LS environmental mat samples
356 (Crepeau, 2010).

357 The 16s rRNA gene bank of transcripts revealed previously undetected
358 *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* heterotrophs and six OTUs affiliated
359 to *Epsilonproteobacteria* among which five did not appear in this previous
360 characterization study. In fact, there is accumulating evidence that
361 *Epsilonproteobacteria* as well as *Gammaproteobacteria* might constitute the major
362 part of the bacterial community in LS mats as in others deep-sea hydrothermal vent
363 habitats (Reysenbach et al., 2000; Nakagawa and Takai, 2008). Also, a clone closely
364 related to a putative *Osedax mucofloris* symbiont (Verna et al., 2010) was identified.
365 This show similitude between deep-sea chemosynthetic environments and support

366 the hypothetic role of whale falls and sunken woods as dispersal stepping stones for
367 a subset of the vent and seep faunas (Smith and Baco, 2003).

368 The functional gene banks of transcripts enlarge our knowledge about the autotroph
369 and lithotroph diversity as previously retrieved. We observed that various active
370 micro-organisms use the ATP-citrate lyase and the APS or SoxB metabolic
371 pathways, showing the richness of metabolic diversity in microbial mats. Hence our
372 work confirmed that enrichment culture combined to molecular studies as interesting
373 way to reveal metabolic capability and minor part communities of complex samples.

374 **Acknowledgements**

375 We thank captain and crew of the *Pourquoi Pas ?*, chiefs scientists of the Bathyluck-
376 09 cruise and Victor 6000 ROV team. We also gratefully acknowledge Stéphane
377 l'Haridon for his suggestions. This work was done with the financial support of the
378 ANR Deep Oases and the GDR ECCHIS.

379 **References**

- 380 **Amann, R., Krumholz, L., and Stahl, D.** (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for
381 determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of bacteriology* **172**:
382 762.
- 383 **Blazejak, A., Kuever, J., Erseus, C., Amann, R., and Dubilier, N.** (2006) Phylogeny of 16S rRNA,
384 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase
385 genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (Oligochaeta) from
386 Bermuda and the Bahamas. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5527-5536.
- 387 **Byrne, N., Lesongeur, F., Bienvenu, N., Geslin, C., Alain, K., Prieur, D., and Godfroy, A.** (2009) Effect
388 of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys,
389 cultured in a bioreactor. *Extremophiles* **13**: 595-608.
- 390 **Camp, C., and Sublette, K.** (1992) Control of a thiobacillus denitrificans bioreactor using machine
391 vision. *Biotechnology and bioengineering* **39**: 529-538.
- 392 **Campbell, B.J., Stein, J.L., and Cary, S.C.** (2003) Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial
393 community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Applied and*
394 *Environmental Microbiology* **69**: 5070-5078.
- 395 **Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., and Takai, K.** (2006) The versatile epsilon-proteobacteria:
396 key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 458-468.
- 397 **Corre, E., Reysenbach, A.L., and Prieur, D.** (2001) Proteobacterial diversity from a deep-sea
398 hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Letters* **205**: 329-335.

- 399 **Crepeau, V.** (2010) Diversity and function in Lucky Strike microbial mats. *Submitted to FEMS*
400 *microbiology*.
- 401 **Cuvelier, D., Sarrazin, J., Colaço, A., Copley, J., Desbruyères, D., Glover, A. et al.** (2009) Distribution
402 and spatial variation of hydrothermal faunal assemblages at Lucky Strike (Mid-Atlantic Ridge)
403 revealed by high-resolution video image analysis. *Deep-Sea Research Part I* **56**: 2026-2040.
- 404 **Cuvelier, D., Sarradin, P.M., Sarrazin, J., Colaço, A., Copley, J., Desbruyères, D. et al.** (in press)
405 Hydrothermal faunal assemblages and habitat characterisation at the Atlantic Eiffel Tower edifice
406 (Lucky Strike vent field).
- 407 **DeChaine, E., and Cavanaugh, C.** (2005) Symbioses of methanotrophs and deep-sea mussels
408 (Mytilidae: Bathymodiolinae). *Molecular Basis of Symbiosis*: 227–249.
- 409 **Delbès, C., Moletta, R., and Godon, J.** (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA
410 dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* **35**:
411 19-26.
- 412 **Dorigo, U., Volatier, L., and Humbert, J.** (2005) Molecular approaches to the assessment of
413 biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* **39**: 2207-2218.
- 414 **Duperron, S., Fiala-Medioni, A., Caprais, J.C., Olu, K., and Sibuet, M.** (2007) Evidence for
415 chemoautotrophic symbiosis in a Mediterranean cold seep clam (Bivalvia : Lucinidae): comparative
416 sequence analysis of bacterial 16S rRNA, APS reductase and RubisCO genes. *Fems Microbiology*
417 *Ecology* **59**: 64-70.
- 418 **Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, A., Pernthaler, A., McKiness, Z.P. et al.** (2006) A dual
419 symbiosis shared by two mussel species, Bathymodiolus azoricus and Bathymodiolus puteoserpentis
420 (Bivalvia : Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental*
421 *Microbiology* **8**: 1441-1447.
- 422 **Durand, L., Zbinden, M., Cuff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E., Shillito, B., and Cambon-**
423 **Bonavita, M.** (2010) Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp Rimicaris exoculata
424 gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 291-303.
- 425 **Elsaied, H., and Naganuma, T.** (2001) Phylogenetic Diversity of Ribulose-1, 5-Bisphosphate
426 Carboxylase/Oxygenase Large-Subunit Genes from Deep-Sea Microorganisms. *Applied and*
427 *Environmental Microbiology* **67**: 1751-1765.
- 428 **Gerasimchuk, A.L., Shatalov, A.A., Novikov, A.L., Butorova, O.P., Pimenov, N.V., Lein, A.Y. et al.**
429 (2010) The search for sulfate-reducing bacteria in mat samples from the lost city hydrothermal field
430 by molecular cloning. *Microbiology* **79**: 96-105.
- 431 **Godfroy, A., Postec, A., and Raven, N.** (2006) 4 Growth of Hyperthermophilic Microorganisms for
432 Physiological and Nutritional Studies. *Methods in Microbiology* **35**: 93-108.
- 433 **Goffredi, S.K., Jones, W.J., Erlich, H., Springer, A., and Vrijenhoek, R.C.** (2008) Epibiotic bacteria
434 associated with the recently discovered Yeti crab, Kiwa hirsuta. *Environmental Microbiology* **10**:
435 2623-2634.
- 436 **Grunke, S., Lichtschlag, A., de Beer, D., Kuypers, M., Losekann-Behrens, T., Ramette, A., and**
437 **Boetius, A.** (2010) Novel observations of Thiobacterium, a sulfur-storing Gammaproteobacterium
438 producing gelatinous mats. *Isme Journal* **4**: 1031-1043.
- 439 **Hirayama, H., Sunamura, M., Takai, K., Nunoura, T., Noguchi, T., Oida, H. et al.** (2007) Culture-
440 Dependent and -Independent Characterization of Microbial Communities Associated with a Shallow
441 Submarine Hydrothermal System Occurring within a Coral Reef off Taketomi Island, Japan. *Appl*
442 *Environ Microbiol* **73**: 7642-7656.

- 443 **Hügler, M., Gärtner, A., and Imhoff, J.F.** (2010) Functional genes as markers for sulfur cycling and
444 CO₂ fixation in microbial communities of hydrothermal vents of the Logatchev field. *FEMS*
445 *Microbiology Ecology* **73**: 526-537.
- 446 **Inagaki, F., Takai, K., Neilson, K.H., and Horikoshi, K.** (2004) *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov.,
447 sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the {varepsilon}-Proteobacteria isolated
448 from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1477-1482.
- 449 **Inagaki, F., Kuypers, M.M.M., Tsunogai, U., Ishibashi, J., Nakamura, K., Treude, T. et al.** (2006) From
450 the Cover: Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough
451 hydrothermal system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 14164.
- 452 **Kato, S., Kobayashi, C., Kakegawa, T., and Yamagishi, A.** (2009) Microbial communities in iron-silica-
453 rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental*
454 *Microbiology* **11**: 2094-2111.
- 455 **Kirchman, D.** (2002) The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *Fems*
456 *Microbiology Ecology* **39**: 91-100.
- 457 **Kolganova, T., Kuznetsov, B., and Tourova, T.** (2002) Designing and testing oligonucleotide primers
458 for amplification and sequencing of archaeal 16S rRNA genes. *Microbiology* **71**: 243-246.
- 459 **Kormas, K., Meziti, A., Dählmann, A., De Lange, G., and Lykousis, V.** (2008) Characterization of
460 methanogenic and prokaryotic assemblages based on mcrA and 16S rRNA gene diversity in
461 sediments of the Kazan mud volcano (Mediterranean Sea). *Geobiology* **6**: 450-460.
- 462 **Kormas, K.A., Smith, D.C., Edgcomb, V., and Teske, A.** (2003) Molecular analysis of deep subsurface
463 microbial communities in Nankai Trough sediments (ODP Leg 190, Site 1176). *FEMS Microbiology*
464 *Ecology* **45**: 115-125.
- 465 **L'Haridon, S., Reysenbach, A., Tindall, B., Schönheit, P., Banta, A., Johnsen, U. et al.** (2006)
466 *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermovibrio*
467 *guaymasensis* sp. nov., three thermophilic members of the Desulfurobacteriaceae fam. nov., a deep
468 branching lineage within the Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
469 *Microbiology* **56**: 2843.
- 470 **Lane, D.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* **1**: 115–
471 176.
- 472 **Larimer, F., Lu, T., and Bailey, D.** (1995) Sequence and expression of the form II ribulose
473 bisphosphate carboxylase/oxygenase (RUBISCO) gene from *Rhodobacter capsulatus*. *FASEB J* **9**:
474 A1275.
- 475 **Lin, X., Wakeham, S., Putnam, I., Astor, Y., Scranton, M., Chistoserdov, A., and Taylor, G.** (2006)
476 Comparison of vertical distributions of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black
477 Sea by use of fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2679.
- 478 **Lösekan, T., Robador, A., Niemann, H., Knittel, K., Boetius, A., and Dubilier, N.** (2008)
479 Endosymbioses between bacteria and deep-sea siboglinid tubeworms from an Arctic Cold
480 Seep(Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea). *Environmental Microbiology* **10**: 3237-3254.
- 481 **Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., and Schleifer, K.** (1996) Application of a suite of
482 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-
483 Flavobacter-Bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**: 1097.
- 484 **McCliment, E., Voglesonger, K., O'Day, P., Dunn, E., Holloway, J., and Cary, S.** (2006) Colonization of
485 nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage.
486 *Environmental Microbiology* **8**: 114-125.

487 **Meyer, B., and Kuever, J.** (2007) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory
488 adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and
489 evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**: 2026-2044.

490 **Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M.** (1994) Estimation of diversity and community structure
491 through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes
492 from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ*
493 *Microbiol* **60**: 871-879.

494 **Nakagawa, S., and Takai, K.** (2008) Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and
495 ecological significance. *Fems Microbiology Ecology* **65**: 1-14.

496 **Nelson, D.C., and Jannasch, H.G.** (1983) Chemoautotrophic growth of marine *Beggiatoa* in sulfides
497 gradient cultures. *Arch Microbiol* **136**: 262-269.

498 **Petri, R., Podgorsek, L., and Imhoff, J.F.** (2001) Phylogeny and distribution of the soxB gene among
499 thiosulfate-oxidizing bacteria. *Fems Microbiology Letters* **197**: 171-178.

500 **Postec, A., Lesongeur, F., Pignet, P., Ollivier, B., Querellou, J., and Godfroy, A.** (2007) Continuous
501 enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent
502 chimneys. *Extremophiles* **11**: 747-757.

503 **Prosser, J.** (2002) Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil* **244**: 9-17.

504 **Rassa, A., McAllister, S., Safran, S., and Moyer, C.** (2009) Zeta-Proteobacteria Dominate the
505 Colonization and Formation of Microbial Mats in Low-Temperature Hydrothermal Vents at Loihi
506 Seamount, Hawaii. *Geomicrobiology Journal* **26**: 623-638.

507 **Raven, N., Ladwa, N., Cossar, D., and Sharp, R.** (1992) Continuous culture of the hyperthermophilic
508 archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**: 263-267.

509 **Reysenbach, A.L., Longnecker, K., and Kirshtein, J.** (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from
510 an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and*
511 *Environmental Microbiology* **66**: 3798-3806.

512 **Roussel, E., Sauvadet, A.L., Allard, J., Chaduteau, C., Richard, P., Cambon-Bonavita, M.A., and**
513 **Chaumillon, E.** (2009) Archaeal Methane Cycling Communities Associated with Gassy Subsurface
514 Sediments of Marennes-Oléron Bay (France). *Geomicrobiology (in press)* **26**.

515 **Sarradin, P., Waeles, M., Bernagout, S., Le Gall, C., Sarrazin, J., and Riso, R.** (2009) Speciation of
516 dissolved copper within an active hydrothermal edifice on the Lucky Strike vent field (MAR, 37° N).
517 *Science of the Total Environment* **407**: 869-878.

518 **Satomi, M., Kimura, B., Hamada, T., Harayama, S., and Fujii, T.** (2002) Phylogenetic study of the
519 genus *Oceanospirillum* based on 16S rRNA and gyrB genes: emended description of the genus
520 *Oceanospirillum*, description of *Pseudospirillum* gen. nov., *Oceanobacter* gen. nov. and *Terasakiella*
521 gen. nov. and transfer of *Oceanospirillum jannaschii* and *Pseudomonas stanieri* to *Marinobacterium*
522 as *Marinobacterium jannaschii* comb. nov. and *Marinobacterium stanieri* comb. nov. *International*
523 *journal of systematic and evolutionary microbiology* **52**: 739.

524 **Schwedock, J., Harmer, T.L., Scott, K.M., Hektor, H.J., Seitz, A.P., Fontana, M.C. et al.** (2004)
525 Characterization and expression of genes from the RubisCO gene cluster of the chemoautotrophic
526 symbiont of *Solemya velum*: cbbLSQO. *Archives of Microbiology* **182**: 18-29.

527 **Smith, C., and Baco, A.** (2003) Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanography and Marine*
528 *Biology, an Annual Review, Volume 41: An Annual Review* **41**: 311-354.

529 **Stahl, D., and Amann, R.** (1991) Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic acid*
530 *techniques in bacterial systematics* **8**: 207-248.

- 531 **Stevens, H., Stubner, M., Simon, M., and Brinkhoff, T.** (2005) Phylogeny of Proteobacteria and
532 Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *Fems Microbiology Ecology* **54**: 351-365.
- 533 **Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K.** (2004) Microbial Diversity in
534 Inactive Chimney Structures from Deep-Sea Hydrothermal Systems. *Microbial Ecology* **47**: 186-196.
- 535 **Takai, K., Nunoura, T., and Suzuki, Y.** (2007) The microbial diversity in hydrothermal vents in
536 Kermadec Volcanic Arc. *unpublished*.
- 537 **Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F., and Orikoshi, K.** (2001) Distribution of Archaea in a black smoker
538 chimney structure. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3618-3629.
- 539 **Takai, K., Suzuki, M., Nakagawa, S., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Inagaki, F., and Horikoshi, K.** (2006)
540 *Sulfurimonas parvalvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing
541 chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent
542 polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb.
543 nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1725-1733.
- 544 **Takai, K., Campbell, B.J., Cary, S.C., Suzuki, M., Oida, H., Nunoura, T. et al.** (2005) Enzymatic and
545 Genetic Characterization of Carbon and Energy Metabolisms by Deep-Sea Hydrothermal
546 Chemolithoautotrophic Isolates of Epsilonproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7310-7320.
- 547 **Taylor, C.D., Wirsén, C.O., and Gaill, F.** (1999) Rapid Microbial Production of Filamentous Sulfur Mats
548 at Hydrothermal Vents. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2253-2255.
- 549 **Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V.P., and Jannasch, H.** (2002) Microbial diversity of hydrothermal
550 sediments in the Guaymas basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ*
551 *Microbiol* **68**: 1994-2007.
- 552 **Tor, J., Amend, J., and Lovley, D.** (2003) Metabolism of organic compounds in anaerobic,
553 hydrothermal sulphate reducing marine sediments. *Environmental Microbiology* **5**: 583-591.
- 554 **Verna, C., Ramette, A., Wiklund, H., Dahlgren, T., Glover, A., Gaill, F., and Dubilier, N.** (2010) High
555 symbiont diversity in the bone-eating worm *Osedax mucofloris* from shallow whale-falls in the North
556 Atlantic. *Environmental Microbiology* **12**: 2355-2370.
- 557 **Waits, J., and Leberg, P.** (2000) Biases associated with population estimation using molecular
558 tagging. *Animal Conservation* **3**: 191-199.
- 559 **Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J.** (2003) Assessment of bacterial
560 community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a
561 cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods* **55**: 155-164.
- 562 **Wirsén, C.O., Sievert, S.M., Cavanaugh, C.M., Molyneux, S.J., Ahmad, A., Taylor, L.T. et al.** (2002)
563 Characterization of an Autotrophic Sulfide-Oxidizing Marine Arcobacter sp. That Produces
564 Filamentous Sulfur *Appl Environ Microbiol* **68**: 316-325.
- 565 **Zbinden, M., Shillito, B., Le Bris, N., de Villardi de Montlaur, C., Roussel, E., Guyot, F. et al.** (2008)
566 New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the
567 hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **359**:
568 131-140.

569

570

Tables

Table 1. Clones identified in the twelve transcript 16S RNA libraries (T4 to T85)

OTU	closest sequence in bank	Affiliation	Accession	%	T4	T8	T12	T16	T21	T31	T38	T44	T49	T60	T71	T85	Equivalent*
LSmat.Fer.02	<i>Vibrio gallicus</i>	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Vibrionales</i>	AJ440009	99						8	4	3	5	4	3	2	LSmat.B51
LSmat.Fer.28	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Vibrionales</i>	FM954972	95	14	5	3	3	2	5							LSmat.B52
LSmat.Fer.04	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Alteromonadales</i>	AJ874351	99	10	3	2	2	3								LSmat.B52
LSmat.Fer.06	Heterotrophic exosymbiont of <i>Adipicola pacifica</i> <i>Colwellia</i> sp.	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Alteromonadales</i>	AB539012 DQ027051	96 95			3	2	7								
LSmat.Fer.08	<i>Oleispira antarcticam</i>	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Oceanospirillales</i>	AJ426421	98			4	3	3	1	2	2	3	2	1		
LSmat.Fer.09	<i>Marinobacter vinifirmus</i>	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Alteromonadales</i>	DQ235263	99	7										3	4	
LSmat.Fer.35	clone from East Lau Spreading Centre <i>Thalassomonas loyana</i>	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Alteromonadales</i>	GQ848478 AY643537	96 95							1	1	1	1			LSmatB44
LSmat.Fer.26	Bacterium endosymbiont of <i>Osedax mucofloris</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN773238	99			1	1									
LSmat.Fer.11	Alpha proteobacterium STF-07 <i>Terasakiella pusilla</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhizobiales</i>	EU594271 NR_024656	98 96		3	1				2	5					
LSmat.Fer.38	Alpha proteobacterium STF-07 <i>Terasakiella pusilla</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhizobiales</i>	EU594271 NR_024656	91 89		1											
LSmat.Fer.15	<i>Tenacibaculum discolor</i>	<i>Bacteroidetes</i> <i>Flavobacteriales</i>	AM411030	99		4	2	2	1	2							
LSmat.Fer.16	u bact <i>Vitellibacter vladvostokensis</i>	<i>Bacteroidetes</i> <i>Flavobacteriales</i>	CU915004 NR_028631	98 97							3	2	2	3	3	5	
LSmat.Fer.37	clone from shallow hydrothermal vents mats	<i>Bacteroidetes</i>	GU369876	92	2	1											LSmatB120
LSmat.Fer.39	urchin <i>Strongylocentrotus intermedius</i> associated clone (voir Fer.37)	<i>Bacteroidetes</i>	EU626564 GU369876	95 93	3	1					1						LSmatB120
LSmat.Fer.17	clone from East Lau Spreading Center	<i>Epsilonproteobacteria</i>	GQ848449	99					1	1	1				2	1	LSmat.B94
LSmat.Fer.18	Yellow Sea water clone Uncultured epsilon from cold seep	<i>Epsilonproteobacteria</i>	HM057704 FN429802	98 97				4	1	2	3	2	3	4	1	3	
LSmat.Fer.20	clone from Arctic sediment uncultured <i>Arcobacter</i> sp	<i>Epsilonproteobacteria</i> <i>Campylobacterales</i>	EU050947 AY697901	98 96				2	2	1	1	3					
LSmat.Fer.21	oyster mantle clone Oy-M7 (Vancouver Island)	<i>Epsilonproteobacteria</i>	DQ357826	99	4	2	4	3	3	3	5	4	4	2	3	4	
LSmat.Fer.27	clone boneC3B7 oyster mantle clone Oy-M7 (Vancouver Island)	<i>Epsilonproteobacteria</i>	AY548991 DQ357826	94 92			2	2			1	1					
LSmat.Fer.34	Enrichment culture clone EB24.3 (Norway) <i>Arcobacter</i> sp.	<i>Epsilonproteobacteria</i> <i>Campylobacterales</i>	EU573099 DQ514311	99 96							1						

*Equivalent: precise if we observed a similar sequence in our previous characterization of the mat bacterial diversity (Crepeau, 2010).

The shaded boxes indicate the OTU absence into the selected library; if the OTU is present, the number of representative clones is specified.

574
575**Table 2.** Clones identified in transcript RNA libraries built with *aprA*, *soxB* and *acIB* gene sequences

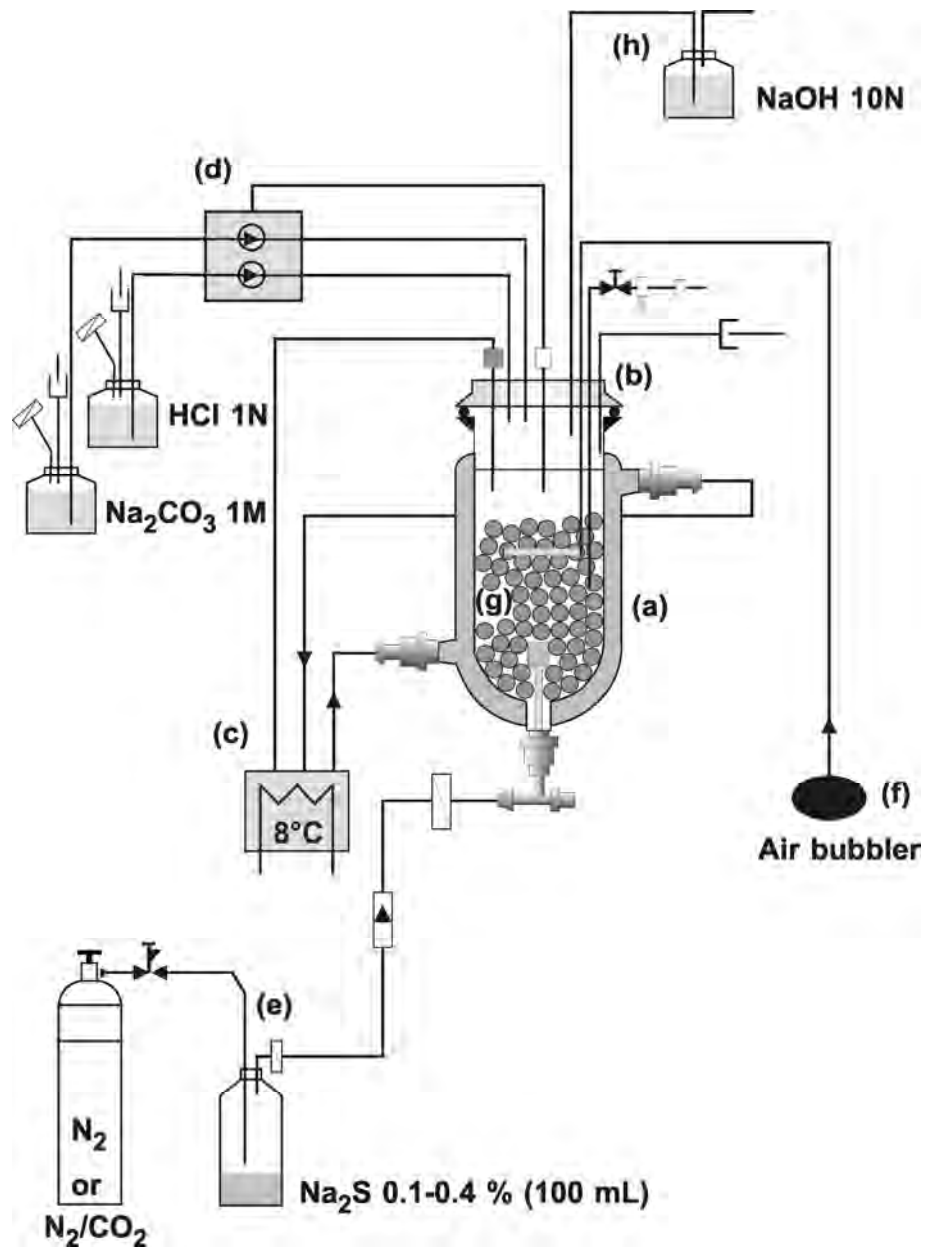
	OTU	closest sequence in bank	Affiliation	accession	%	T4	T8	T12	T16	T21	T31	T38	T44	T49	T60	T71	T85	Equivalent*
<i>aprA</i>	LS.Fer.APS.01	<i>Asterechinus elegans</i> gut clone	<i>Gammaproteobacteria</i>	FM879016	91			8	5	4	3	7	8	7	3	2	4	
	LS.Fer.APS.02	clone from cold seep vestimentiferan <i>Asterechinus elegans</i> gut clone	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	FM165456 FM879013	97 86				3						2	2	3	LSmat.RNA.APS.02
	LS.Fer.APS.03	clone from cold seep vestimentiferan	<i>Gammaproteobacteria</i>	FM165456	96				1	3	3				3	4		
	LS.Fer.APS.04	<i>Candidatus Ruthia magnifica</i> str. Cm	<i>Gammaproteobacteria</i>	CP000488	95					2	3							
<i>soxB</i>	LS.Fer.soxB.01	Logatchev clone from mussel patch <i>Allochromatium vinosum</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	FN562765 DQ441405	73 69			7			8	8			7	9	7	
	LS.Fer.acIB.03	Logatchev clone from mussel patch	<i>Epsilonproteobacteria</i> group F	FN562668	99				1									
<i>acIB</i>	LS.Fer.acIB.04	<i>Candidatus Arcobacter sulfidicus</i>	<i>Epsilonproteobacteria</i> <i>Campylobacteriales</i>	AAQ76339	87			1		2	1		1		1	1	2	LSmat_acIB03
	LS.Fer.acIB.05	Logatchev clone from mussel patch	<i>Epsilonproteobacteria</i> group F	FN562674	97		8	7	8	7	7	7	8	9	8	8	7	
	LS.Fer.acIB.06	Logatchev clone from mussel patch	<i>Epsilonproteobacteria</i>	FN562682	98				1			2						

576
577

*Equivalent: precise if we observed a similar sequence in our previous characterization of the mat bacterial diversity (Crepeau, 2010)

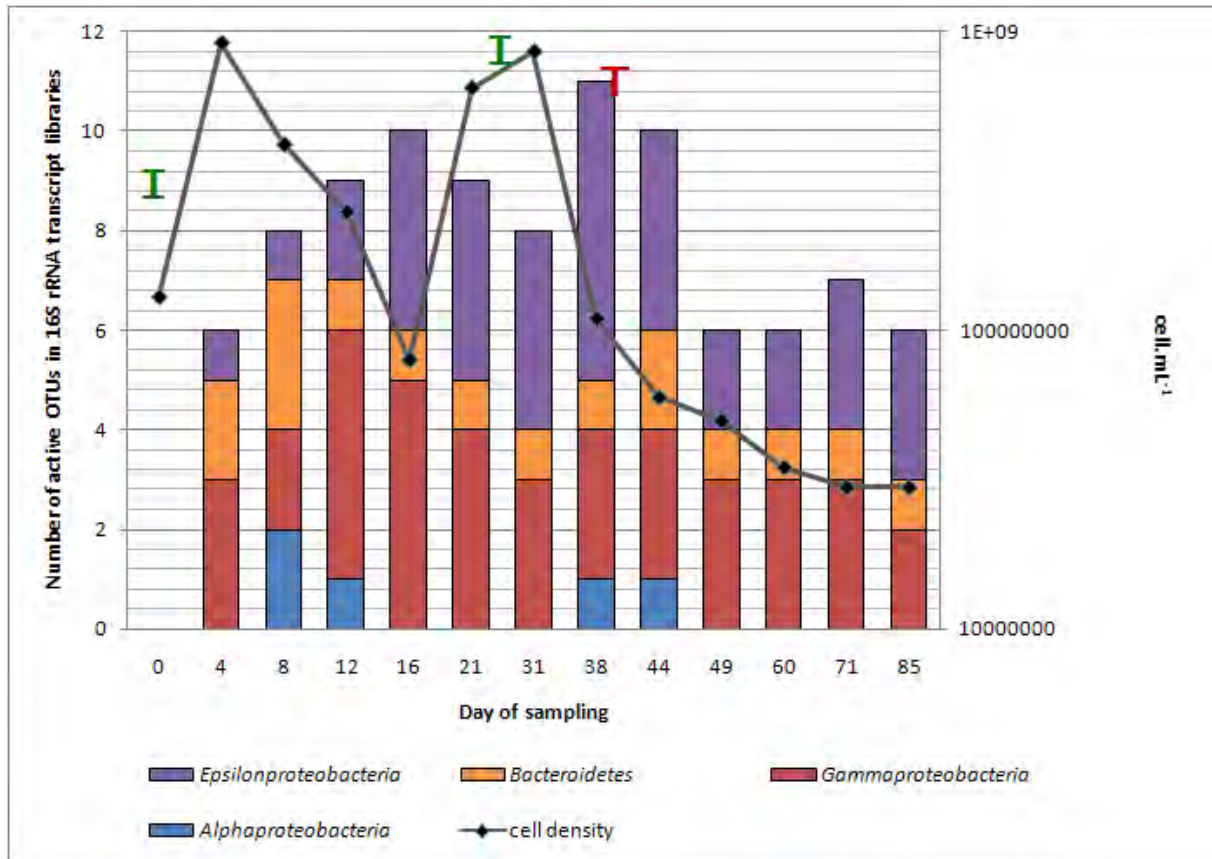
The shaded boxes indicate the OTU absence into the selected library; if the OTU is present, the number of representative clones is specified.

Figures



581

582 **Fig 1.** Experimental cultivation system: (a) opaque tank, (b) teflon platen, (c) cryothermostat, (d) pH
 583 regulation system, (e) flush system providing H₂S to culture, (f) air bubbler, (g) substrata, (h) gas
 584 evacuation and H₂S tapping.



585

586 **Fig 2.** Repartition of active OTUs and cell density at different time. Letters "I" represent the two
 587 inoculations and the "T" indicate the temperature incident at T33.

588

589

590
591

Supplementary data

592 **Table 3.** Primers used during the study
 593

Designation	Specificity	Primer sequence 5'-3'	reference
U1492 R	Universal 16S rDNA	GTTACCTTGTTACGACTT	(Lane, 1991)
E8 F	Bacterial 16S rDNA	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	
A8 F	Archaeal 16S rDNA	CGGTTGATCCTGCCGGA	(Kolganova et al., 2002)
<i>cbbL</i> _1b F	RuBisCO form 1	CACCTGGACCACVGTBTGG	
<i>cbbL</i> _2c R	RuBisCO form 1	CGGTGYATGTGCAGCAGCATICCG	
<i>cbbM</i> 1_Els F	RuBisCO form 2	ATCATCAARCCSAARCTSGGCCTGCGTCC	(Blazejak et al., 2006)
<i>cbbM</i> _2b R	RuBisCO form 2	MGAGGTSACSGCRCRTGRCCRGCMCGRTG	
<i>cbbM</i> 2_Els R	RuBisCO form 2	MGAGGTGACSGCRCCTGRCCRGCMCGRTG	
<i>acB</i> 892 F	ATP-citrate lyase β sub-unit	TGGACMATGGTDGCGYGGKGGT	(Campbell et al., 2003)
<i>acB</i> R		ATAGTTKGGSCCACCTCTTC	
APS1 F	adenosine 5'phospho-sulfate reductase α -sub-unit	TGGCAGATCATGATY MAYGG	(Meyer and Kuever, 2007)
APS4 R		GCGCCAACYGGRCRRTA	
<i>soxB</i> 432F	<i>SoxB</i> component of the periplasmic thiosulfate-oxidizing Sox enzyme complex	GAYGGNGGNGAYCANTGG	(Petri et al., 2001)
<i>soxB</i> 693F		ATCGGNCARGCNTTYCCNTA	
<i>soxB</i> 1164R		AARTTNCCNCGNCGRTA	
<i>soxB</i> 1446R		CATGTCNCCNCRTGYTG	

594

595 **Table 4.** Probes used during the study
 596

Designation	Fluoro- chrome	Formal- dehyde	Specificity	Probes sequence 5'-3'	Référence
eub338	Cy5	40	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(Amann et al., 1990)
arch915	Cy3	30	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCAATTCCT	(Stahl and Amann, 1991)
epsi549	Cy3	45	<i>Epsilonproteobacteria</i>	CAGTGATTCCGAGTAACG	(Lin et al., 2006)
gam42a	Cy3	40	<i>Gammaproteobacteria</i>	GCCTCCCACATCGTTT	(Manz et al., 1996)

597

598
599

Table 5. Clones identified in DNA or transcript RNA libraries built with *aprA* and *soxB* gene sequences

OTU	Affiliation	Closest sequence in bank	Accession	%	Equivalent*
LS.Fer.APS.05	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Asterechinus elegans</i> gut clone Logatchev clone from mussel patch	FM879006 FN562702	96 93	LSmat.APS07
LS.Fer.APS.06	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lamellibrachia</i> sp. tube clone Logatchev clone from mussel patch	FM165456 FN562705	98 96	LSmat.APS04
LS.Fer.APS.07	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Logatchev clone from mussel patch</i> <i>Lamellibrachia</i> sp. tube clone	FN562724 FM165457	90 86	LSmat.APS05
LS.Fer.APS.08	Unclassified <i>bacteria</i>	<i>Oligobrachia haakonmosbiensis</i> endosymbiont	AM883193	95	LSmat.APS03
LS.Fer.APS.09	Unclassified <i>bacteria</i>	<i>Kiwa jirsuta</i> associated clone	EU265804	96	LSmat.APS02
LS.Fer.APS.10	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Asterechinus elegans</i> gut clone	FM879005	82	
LS.Fer.APS.11	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Asterechinus elegans</i> gut clone	FM878954	92	
LS.Fer.APS.12	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Asterechinus elegans</i> gut clone Logatchev clone from mussel patch	FM879014 FN562717	96 95	
LS.Fer.APS.01	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Asterechinus elegans</i> gut clone	FM879016	91	
LS.Fer.APS.02	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i>	clone from cold seep vestimentiferan <i>Asterechinus elegans</i> gut clone	FM165456 FM879013	97 86	LSmat.RNA.APS.02
LS.Fer.APS.03	<i>Gammaproteobacteria</i>	clone from cold seep vestimentiferan	FM165456	96	
LS.Fer.APS.04	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Candidatus Ruthia magnifica</i> str. Cm	CP000488	95	
LS.Fer.soxB.01	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Logatchev clone from mussel patch</i> <i>Allochromatium vinosum</i>	FN562765 DQ441405	73 69	
LS.Fer.soxB.02	<i>Alphaproteobacteria</i>	hydrothermal clone HY-103 from Fiji Basin	AJ294328	85	LSmat.soxB03
LS.Fer.soxB.03	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>hydrothermal clone HY-103 from Fiji</i> <i>Basin</i>	AJ294328	76	LSmat.soxB01
LS.Fer.soxB.04	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodovulum adriaticum</i>	EF618592	83	LSmat.soxB02
LS.Fer.soxB.05	<i>Gammaproteobacteria</i>	Logatchev clone from mussel patch endosymbiont of <i>Ifremeria nautilei</i>	FN562767 EF618614	97 72	LSmat.soxB06
LS.Fer.soxB.06	<i>Gammaproteobacteria</i>	sulfur-oxidizing bacterium OBII5	EF618612	74	LSmat.soxB08
LS.Fer.soxB.07	<i>Gammaproteobacteria</i>	sulfur-oxidizing clone str. manganese crust	EF618615	86	LSmat.soxB07
LS.Fer.soxB.08	<i>Epsilonproteobacteria</i>	Logatchev clone from mussel patch	FN562774	96	
LS.Fer.soxB.09	<i>Epsilonproteobacteria</i>	Logatchev clone from mussel patch	FN562785	98	

600
601

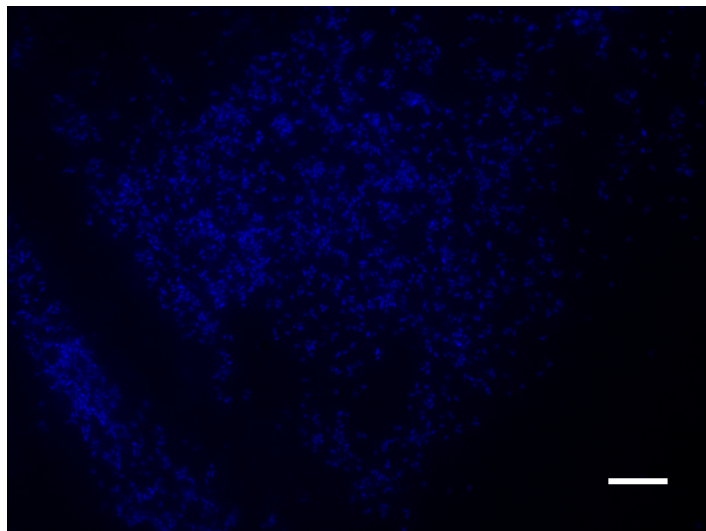
*equivalent: precise if we observed a similar sequence in our previous characterization of the mat bacterial diversity (Crepeau, 2010)

602 **Table 6.** Clones identified in DNA libraries built with *cbbL*, *cbbM* and *acIB* gene sequences
 603

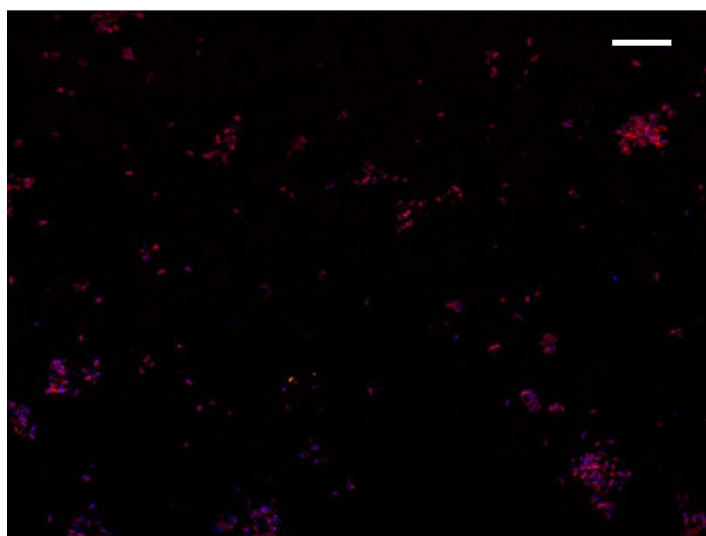
OTU	Affiliation	Closest sequence in bank	Accession	%	Equivalent*
LS.Fer.cbbL.01	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lucinoma aff. kazani</i> endosymbiont <i>Solemya velum</i> gill symbiont	CAJ85655 AAT01429	98 98	LSmat_cbbL01
LS.Fer.cbbL.02	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Solemya velum</i> gill symbiont	AAT01429	91	LSmat_cbbL02
LS.Fer.cbbL.03	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Solemya velum</i> gill symbiont	AAT01429	92	LSmat_cbbL03
LS.Fer.cbbM.01	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Thiobacillus</i> sp. 'Lamellibrachia symbiont-2'	BAA94433	83	LSmat_cbbM02
LS.Fer.cbbM.02	Unclassified <i>bacteria</i>	Clone of <i>Lamellibrachia</i> sp. tube	CAQ63481	93	LSmat_cbbM03
LS.Fer.cbbM.03	<i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	AAB82048	84	LSmat_cbbM05
LS.Fer.cbbM.04	<i>Epsilonproteobacteria</i>	Symbionts of tubeworm <i>Ridgeia</i> <i>piscisae</i>	ABY77947	83	LSmat_cbbM06
LS.Fer.acIB.01	<i>Epsilonproteobacteria</i> <i>Campylobacterales</i>	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> DSM 16294	AAZ74674	90	LSmat_acIB01
LS.Fer. acIB.02	<i>Epsilonproteobacteria</i> Unclassified <i>Bacteria</i>	Clone A11 associated with <i>Kiwa hirsuta</i> <i>Alvinella pompejana</i> episymbiont	ABY75262) AAQ76334	98 97	LSmat_acIB02
LS.Fer.acIB.03	<i>Epsilonproteobacteria</i> group F	Logatchev clone from mussel patch	FN562668	99	
LS.Fer.acIB.04	<i>Epsilonproteobacteria</i> <i>Campylobacterales</i>	<i>Candidatus Arcobacter sulfidicus</i>	AAQ76339	87	LSmat_acIB03
LS.Fer.acIB.05	<i>Epsilonproteobacteria</i> group F	Logatchev clone from mussel patch	FN562674	97	
LS.Fer.acIB.06	<i>Epsilonproteobacteria</i>	Logatchev clone from mussel patch	FN562682	98	

604 *Equivalent: precise if we observed a similar sequence in our previous characterization of the mat bacterial
 605 diversity (Crepeau, 2010)

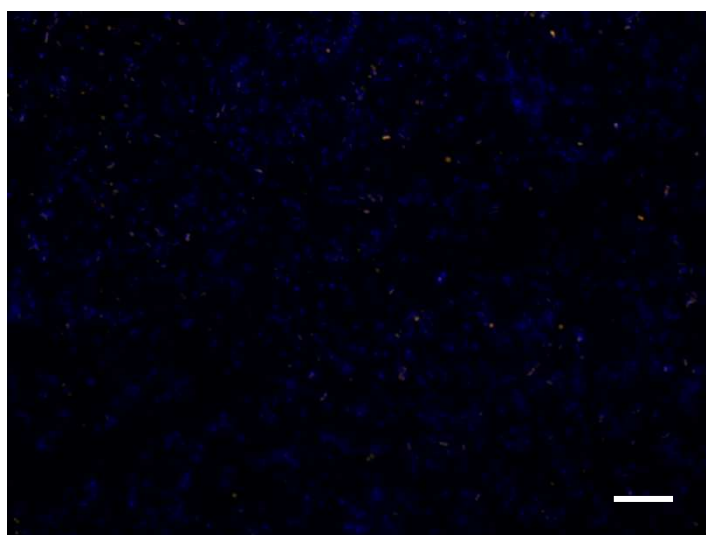
606



607



608



609 **Fig. 3.** Whole-cell hybridization of various bacteria in 3 different samples (in progress). Top: arch915
610 probe (orange) for *Archaea* on T4 sample. Amid: eub338 probe (red) for *Eubacteria*, epsi549 probe
611 (orange) for *Epsilonproteobacteria* and DAPI coloration (blue) on T8 sample. Bottom: epsi549 probe
612 (orange) for *Epsilonproteobacteria* and DAPI coloration (blue) on T16 sample. Bar, 25 μ m.

3.4. Cultures d'enrichissement en batch

Feu sous les Açores
Les *Beggiatoa* rigolent,
Un *Vibrio* pousse.

3.4.1. Cultures gélosées en gradients

Aucune des cultures mises en œuvre n'a permis l'enrichissement de bactéries filamenteuses. Une lyse totale des filaments a été constatée dans toutes les cultures après un temps allant de deux à huit jours (jusqu'à dix en cas de repiquage) en fonction des conditions testées. En parallèle, le développement rapide de petits bacilles de type *Vibrionales* a été observé.

L'effort réalisé pendant la campagne Bathyluck pour prélever de façon rapide les filaments sur les moules échantillonnées, en limitant les chocs thermiques et mécaniques, a permis de maintenir des cultures plus de trois jours, ce qui n'avait pas été le cas durant la campagne MoMAR-08.

Le pH de 7 pour les milieux de culture semble le plus adapté mais la différence constatée avec le pH de 6,5 n'est pas réellement significative : un à deux jours de sursis avant la lyse des filaments. Par contre, réaliser des cultures avec une phase gazeuse réduite et effectuer des repiquages tous les trois jours permet de garder des filaments intacts en culture pendant une dizaine de jours. Le développement plus rapide d'hétérotrophes aérobies nuisant aux *Beggiatoa* en cas de phase gazeuse importante pourrait expliquer ce phénomène. Le fait que des repiquages permettent de maintenir les *Beggiatoa* en cultures entre deux et trois jours de plus semble confirmer l'impact négatif des hétérotrophes. L'apport de 0,5 mM de Na_2S dans le milieu de culture (en plus des 4 mM contenus dans la phase gélosée inférieure, cf. Annexe 2), semble également participer à la survie des *Beggiatoa*, probablement en ralentissant le développement des hétérotrophes aérobies. L'acétate n'a par contre pas eu d'influence sur la croissance ou la survie des filamenteuses.

3.4.2. Cultures de méthanotrophes et de sulfo-oxydants

Afin de cultiver les micro-organismes lithoautotrophes détectés lors des inventaires moléculaires réalisés, plusieurs types de cultures d'enrichissement ont été mis en place et différents milieux et techniques de cultures décrites dans la littérature ont été utilisés.

Des PCR directes, avec des amorces spécifiques des gènes de fonction, ont montré que des micro-organismes liés à l'oxydation du méthane et du soufre ont été enrichis dans certaines des cultures en batch réalisées. Les tentatives d'isolement n'ont toutefois pas permis

d'obtenir des souches nouvelles. Les conditions de température et de pH choisies étant peu sélectives, elles ont permis à des *Gammaproteobacteria* hétérotrophes de se développer dans la plupart des milieux (Tableau 9).

Tableau 9. Synthèse des cultures en batch réalisées et résultats obtenus.

Milieu	Campagne	<i>pmoA</i>	<i>aprA</i>	<i>soxB</i>	Observations	Espèces isolées	
ANMS		✓			petits bacilles et coques	<i>Vibrionales</i>	
Fluide filtré + CH ₄		✗					
MJmet		✓				<i>Vibrionales</i>	
MMJHS	MoMAR-08		✓	✓	bacilles et coques	<i>Vibrionales</i> et <i>Thiobacillus denitrificans</i>	
113			✓	✗	petits bacilles et coques	<i>Vibrionales</i>	
Teske				✓	✗	bacilles et coques	<i>Pseudoalteromonadales</i>
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>						bacilles et coques	<i>Pseudoalteromonadales</i>
ANMS	Bathyluck	✗			petits bacilles et coques		
MJmet		✓				<i>Vibrionales</i>	
MMJHS			✓	✓		<i>Vibrionales</i>	

4. Bilan et perspectives

4.1. Bilan sur les techniques utilisées

4.1.1. Techniques d'échantillonnages

À la différence des tapis microbiens présents au niveau des zones de suintements froids ou d'environnements comme le bassin de Guaymas, les tapis du site de Lucky Strike sont peu épais et recouvrent différents substrats solides auxquels ils sont attachés. Il n'est donc pas possible de les prélever avec un carottier-lame et difficile de les aspirer en quantité suffisante sans les endommager par le système de pompage du ROV. La méthode la plus simple et efficace est donc de gratter rapidement des substrats recouverts de tapis prélevés à l'aide du bras robotisé du VICTOR et placés dans des boites décontaminées. Ces manipulations doivent être effectuées en champ stérile (hotte à flux laminaire plutôt que bec bunsen pour ne pas causer de choc thermique), avec des instruments décontaminés.

4.1.2. Approches moléculaires

Les approches moléculaires mises en place ont permis, en s'affranchissant des difficultés liées aux cultures de bactéries lithoautotrophes, de caractériser les communautés microbiennes au sein des tapis de Lucky Strike. La justesse des images de la diversité microbienne obtenues avec ces approches moléculaires doit cependant être relativisée en raison de biais liés aux techniques de PCR, d'extraction et de clonage (Wintzingerode et al., 1997) : l'abondance d'un OTU dans une banque de clones ne reflète pas nécessairement son abondance réelle de l'échantillon original et son absence indique seulement qu'il n'a pas été détecté (Teske and Sorensen, 2008). La faible valeur de l'indice de recouvrement de Good (55,1%) pour la banque des séquences bactériennes du gène de l'ARNr 16S indique, de plus, que seules les espèces dominantes, ou dont l'ADN a été facilement extrait, ont été amplifiées et détectées.

Nos résultats soulignent en outre la nécessité d'utiliser des amorces spécifiques pour amplifier le gène de l'ARNr 16S d'espèces faiblement représentées ou de groupes spécifiques ; groupes qui ne sont pas identifiés avec des amorces universelles. Nous avons par exemple constaté que, même si des séquences affiliées aux *Planctomycetes* ont été

identifiées, aucune d'entre elles n'était affiliée au groupe anammox (oxydation anaérobie de l'ammonium) qui a pourtant été détecté dans les mêmes échantillons au cours d'une étude précédente (Byrne et al., 2008) (cette publication, dont je suis co-auteur, est présentée en Annexe 3). L'utilisation d'amorces spécifiques a aussi permis de détecter le symbionte thiotrophe de *B. azoricus* que les amorces bactériennes universelles n'avaient pas amplifié.

Les ARN messagers résultant de la transcription de gènes de fonction ont une durée de vie courte au sein de la cellule et constituent donc des indicateurs directs des processus métaboliques actifs au moment du prélèvement. Ceci en fait des témoins de l'activité microbienne plus pertinents que les ARN ribosomiaux qui peuvent persister plusieurs jours dans l'environnement après une lyse cellulaire (Chin et al., 2008; Lloyd et al., 2010). Dans cette étude, les deux « types » d'ARN ont donc été utilisés comme marqueurs.

L'assignation phylogénétique et le rôle des populations bactériennes ont été difficiles à déterminer en raison de la présence de nombreuses séquences de clones ayant moins de 94% de similarité avec les plus proches isolats connus. La plupart de ces séquences pourraient représenter de nouveaux genres ou familles à découvrir. Inférer un phénotype possible aux organismes détectés dans cette étude doit donc être fait avec prudence. Cela est particulièrement vrai pour les groupes phylogénétiques rassemblant des organismes phénotypiquement très divers tels que les *Proteobacteria*. Pour l'analyse des banques de gènes de fonction, la situation est encore plus compliquée en raison du faible nombre de séquences de gènes de fonction dans les banques de données, ainsi que de la surreprésentation des séquences liées aux symbiontes de la faune hydrothermale.

4.1.3. Approches culturelles

Les cultures en batch ont permis d'enrichir des organismes liés à l'oxydation du méthane et du soufre mais pas de les isoler ; des *Gammaproteobacteria* hétérotrophes s'étant imposées dans la plupart des cultures d'isolements. L'utilisation de milieux gélosés réalisés, non pas à base d'agar, qui peut être consommé par certains hétérotrophes, mais à base d'un composant inorganique comme la silice, pourrait peut-être favoriser l'isolement des lithoautotrophes (Christian Mustin, communication personnelle).

4.1.4. Suivi moléculaire en fermenteur

Combiner cultures d'enrichissements et suivi moléculaire a permis l'identification de populations probablement marginales dans l'environnement et non retrouvées par les approches de biologie moléculaire sur des échantillons environnementaux, montrant ainsi un moyen intéressant de révéler le potentiel métabolique d'échantillons complexes.

L'aspect peu sélectif des températures et pH mesurés autour des tapis microbiens, conditions reproduites dans le fermenteur, a cependant entraîné le développement rapide et la dominance d'espèces hétérotrophes qui ont peut-être nui au développement des espèces autotrophes ciblées. Réaliser une culture sur le long terme a néanmoins permis d'enrichir une communauté d'*Epsilonproteobacteria* non détectée lors des approches moléculaires réalisées sur les échantillons environnementaux.

Aucun développement de bactéries filamenteuses n'a été constaté. Des adaptations du système doivent donc être imaginées en vue d'une culture à venir. Afin de limiter l'impact potentiellement négatif de certaines espèces hétérotrophes et simuler les mouvements des fluides, un renouvellement automatique et important du milieu de culture pourrait être mis en place. L'inoculation serait alors réalisée par l'ajout, dans la cuve, d'un fragment rocheux recouvert de tapis : cette méthode limiterait et accélérerait les manipulations des fragiles bactéries filamenteuses composant les tapis et permettrait d'imposer un fort renouvellement du milieu sans évacuer l'inoculum. Enfin, utiliser de l'eau de mer (milieu complexe) prélevée *in situ*, filtrée et supplémentée en thiosulfate et Na₂S, pourrait peut être permettre de s'affranchir des éventuelles carences du milieu de culture utilisé.

4.2. Populations observées

4.2.1. Archées

Les résultats de PCR quantitative ont clairement montré l'aspect minoritaire des archées dans la constitution des tapis microbiens de Lucky Strike : ratio de $1/_{2532}$. L'analyse des banques de clones archéens a, quant-à-elle, révélé une population limitée aux *Thaumarchaeota* marines du groupe 1. Parmi ce phylum, presque toutes les séquences

obtenues étaient affiliées à l'espèce *Nitrosopumilus maritimus* (99 % de similarité) et plus lointainement aux espèces géantes *Thaumarchaeota karukerense* et *Thaumarchaeota insulaporcus* (Muller et al., 2010). Le même OTU dominait l'ensemble de la banque de transcrits. Les méthodes de FISH ont permis de rejeter la piste des archées filamenteuses et ont confirmé l'absence presque totale d'archées dans les échantillons de tapis étudiés. Aucune espèce archéenne n'a de surcroît été détectée dans les cultures réalisées en fermenteur ou en batch.

4.2.2. Bactéries

Les résultats obtenus par PCR quantitative, aussi bien que les observations en microscopie, ont mis en évidence une dominance de la communauté bactérienne au sein des tapis.

Les analyses de diversité moléculaire ont montré la présence d'une communauté phylogénétiquement diversifiée, distribuée en 163 OTUs appartenant à sept phylums ; les *Proteobacteria* et les *Bacteroidetes* en constituaient les groupes dominants. Parmi les *Proteobacteria* la classe des *Gammaproteobacteria* était la plus représentée et la plus diversifiée dans nos banques de clones, mais la classe des *Epsilonproteobacteria* comptait également de nombreux représentants. Le suivi en fermenteur a permis de révéler des espèces actives non détectées lors de l'étude sur échantillons environnementaux, en particulier des *Gammaproteobacteria* hétérotrophes et une communauté d'*Epsilonproteobacteria* vraisemblablement autotrophe.

Bien que nos données aient démontré l'existence d'une communauté microbienne très diversifiée dans les tapis microbiens, les observations en microscopie photonique et par FISH ont montré la prédominance d'un type filamenteux (14-65 μm de diamètre) morphologiquement et phylogénétiquement proche d'un de ceux observés dans le système hydrothermal côtier de White Point, en Californie (Jacq et al., 1989; Kalanetra et al., 2004). Les techniques FISH ont confirmé l'appartenance de ce type morphologique au phylum des *Gammaproteobacteria*. D'autres morphologies de filaments, de 1 à 6 μm de diamètre et formant parfois des rosettes, ont également été observé ; les hybridations fluorescentes réalisées ont montré que ces filaments appartenaient pour la plupart aux *Gammaproteobacteria* : seuls certains filaments très fins (diamètre < 1 μm) et rarement

présents dans les coupes observées, n'ont pas été hybridés par les sondes spécifiques des *Gammaproteobacteria* (Planche IV). Les observations par FISH ont également confirmé, en dehors des morphologies filamenteuses, la forte présence des *Gammaproteobacteria* dans nos échantillons (Planche IV).

La frange active de la population bactérienne mise en évidence dans les banques de séquences transcrites du gène codant l'ARNr 16S bactérien ont corroboré les observations microscopiques : presque toutes les séquences obtenues étaient affiliées (99% de similarité) à la séquence du gène codant l'ARNr 16S d'une *Beggiatoa* observée à White Point (Kalanetra et al., 2004). Les seules autres séquences obtenues étaient affiliées, respectivement, à un clone de *Gammaproteobacteria* observé à Lost City (MAR) (Brazelton et al., 2006) et à un clone d'*Alphaproteobacteria* détecté au niveau d'un site hydrothermal de la ride Est-Pacifique (Santelli et al., 2008). La surreprésentation du type filamenteux affilié aux *Beggiatoa* de White Point a probablement masqué l'activité des autres espèces actives, soulignant l'intérêt de coupler l'étude des gènes codant l'ARNr 16S à l'étude des gènes de fonction pour accéder à une image plus complète des populations microbiennes actives.

4.2.3. Champignons

Au total quatre OTUs ont été identifiés en PCR avec les amorces spécifiques du gène codant l'ARNr 18S fongique. L'OTU qui dominait notre banque de clones était affilié à un organisme de l'ordre des *Chytridiales* qui a déjà été détecté à Lucky Strike, à partir d'échantillons prélevés à la surface de coquilles de modioles (Le Calvez et al., 2009).

La coexistence de tapis microbiens et de champignons à la surface des modioles, suggère que les micro-organismes procaryotes disposent de moyens de défenses efficaces contre la probable production fongique de pénicilline (Le Calvez, 2009; Le Calvez et al., 2009) et/ou que les champignons sont fortement minoritaires en termes de biomasse. L'organisation en tapis pourrait également constituer un avantage dans la résistance aux agents antimicrobiens. Les éventuels phénomènes de compétition pour les ressources (composés soufrés et molécules organiques complexes ou non) entre champignons et tapis microbiens restent encore à appréhender.

4.3. Diversité des métabolismes actifs dans les tapis

L'analyse des différentes banques de clones construites a confirmé l'activité et la diversité des populations méthanotrophes et surtout sulfo-oxydantes ; mais a aussi souligné la diversité des hétérotrophes présents dans ces environnements riches en matière organique.

Plus d'un quart des séquences de clones obtenues était en effet affilié au groupe ubiquiste des *Bacteroidetes*, qui regroupe des organismes aux métabolismes variés et pouvant dégrader des molécules complexes. De nombreux clones d'*Alpha* et *Gammaproteobacteria* affiliés à des espèces hétérotrophes ont également été détectés dans les analyses moléculaires des échantillons environnementaux. Le suivi de culture en fermenteur a montré le rapide développement d'une population de *Gammaproteobacteria* hétérotrophes – *Vibrionales* et *Pseudomonadales* essentiellement – après les inoculations, montrant la réactivité de ces deux genres, qui ne représentent pourtant qu'une faible fraction de la diversité des tapis.

Le rapport $\text{CH}_4/\Sigma\text{S}$ sur le site Lucky Strike est l'un des plus faibles parmi ceux mesurés sur les sites hydrothermaux de l'Atlantique, mais l'environnement des tapis présente des taux de CH_4 autorisant la présence de métabolismes basés sur l'oxydation de ce composé. Quelques séquences de la banque codant le gène de l'ARNr 16S étaient affiliées à des *Gammaproteobacteria* des genres *Methylobacter* et *Methylococcus*. L'analyse de la banque du gène *pmoA* a confirmé la diversité, mais aussi l'activité, d'espèces méthanotrophes affiliées, pour certaines, aux *Methylococcales* ; elle a également confirmé la présence, mais pas l'activité, de clones affiliés au symbionte méthanotrophe de *B. azoricus*. Les cultures réalisées durant les campagnes MoMAR-08 et Bathyluck ont permis d'enrichir, mais pas d'isoler, des micro-organismes possédant le gène de la méthane mono-oxygénase particulière.

L'analyse des différentes banques de clones construites, aussi bien celles ciblant le gène codant l'ARNr 16S que celles ciblant des gènes de fonction, souligne l'activité et la diversité des populations sulfo-oxydantes. Le niveau assez faible, mais constant, de sulfures dans l'environnement des tapis (0,8 à 2 μM), ainsi que la présence d'oxygène (230 à 240 μM) (Sarradin et al., 2009; Cuvelier et al., in press) en font un habitat propice pour ces micro-organismes.

La majorité des séquences de clones codant le gène de l'ARNr 16S des bactéries était affiliée à la classe des *Gammaproteobacteria* ; ces séquences étaient pour la plupart reliées à des clones environnementaux venant d'écosystèmes marins profonds, ainsi qu'à des groupes contenant des isolats sulfo et méthano-oxydant ou des symbiontes de la faune hydrothermale, comme ceux de *B. azoricus*. Les banques des gènes *aprA* et *soxB* ont également montré la prééminence et la diversité des sulfo-oxydants, avec de nombreux OTUs affiliés au cluster des *Gammaproteobacteria* symbiotiques (Meyer and Kuever 2007). La banque ARNr 16S de transcrits est, elle, dominée par des séquences de *Gammaproteobacteria* affiliées à une *Beggiatoa*. Notre incapacité à construire une bibliothèque *soxB* de transcrits ne nous a toutefois pas permis de conclure sur l'activité sulfo-oxydante de ce phylotype. L'hypothèse de l'oxydation de composés soufrés réduits comme métabolisme microbien dominant dans les tapis est également renforcée par la présence de séquences affiliées aux classes *Epsilon* et *Alpha* des *Proteobacteria*. L'analyse des banques de séquences des gènes *acIB* et *cbbM* a confirmé la présence d'*Epsilonproteobacteria* autotrophes dans nos échantillons. Des séquences affiliées aux *Alphaproteobacteria* ont été observées dans les banques de gènes de fonction, mais aucune séquence de transcrits n'a été obtenue. Le groupe des *Bacteroidetes* était également très représenté dans la banque ARNr 16S. Ce groupe est principalement constitué d'organotrophes mais présente une grande diversité métabolique incluant la sulfo-oxydation (Teske et al., 2000; Kirchman, 2002; Edwards et al., 2003).

Les cultures en fermenteur et en batch ont permis d'enrichir, mais pas d'isoler, des micro-organismes oxydant les composés soufrés par les voies de d'adénosine phospho-sulfatase et de la sulfite-oxydase. Le suivi de la culture en fermenteur a aussi révélé une communauté d'*Epsilonproteobacteria*, non détectée par les approches moléculaires sur échantillons environnementaux et vraisemblablement liée à la sulfo-oxydation.

4.4. Interactions avec l'environnement

Les relations entre les moules et les tapis sont mal connues, mais il est possible d'esquisser quelques hypothèses. En raison de la coexistence sur les mêmes sites de moules saines recouvertes ou non de tapis microbiens, une relation de type commensal semble constituer

la modèle d'interaction le plus probable, d'autant plus qu'aucun impact significatif des tapis sur les moules n'a été démontré à ce jour (Cuvelier et al., 2009; Martins et al., 2009). Les micro-organismes des tapis pourraient tout de même profiter du relargage de matière organique par les moules, mais également de l'extension de la zone de transition oxygène/anoxique qu'elles peuvent générer. Il a en effet été démontré que des assemblages de *B. thermophilus* pouvaient disperser latéralement les fluides hydrothermaux. Cette dispersion permet aux communautés fauniques de s'étendre, en augmentant la zone de transition oxygène/anoxique où l'oxygène dissous et le sulfure d'hydrogène sont disponibles (Johnson et al., 1994). Les tapis microbiens pourraient donc profiter de cet élargissement de zone pour s'étendre, voire eux-mêmes y participer : il a en effet été observé au niveau de zones de suintements froids du Golfe du Mexique que des tapis de *Beggiatoa* pouvaient former des structures de type voiles qui orientent les fluides (Orcutt et al., 2005).

Des séquences du gène codant l'ARNr 16S, affiliées aux symbiontes thiotrophes et méthanotrophes de *B. azoricus* ont été identifiées dans différents échantillons de tapis par PCR et RT-PCR. Les résultats obtenus par RT-PCR semblent indiquer que ces micro-organismes sont vivants, sinon actifs. Néanmoins, l'absence de séquences affiliées aux symbiontes dans les banques de gènes de fonction pourrait indiquer que les symbiontes ne soient métaboliquement actifs qu'au sein des bactériocytes. La persistance d'ARNr 16S dans l'environnement plusieurs jours après la lyse cellulaire (Chin et al., 2008; Lloyd et al., 2010), ainsi que l'utilisation d'autres voies métaboliques par les symbiontes en dehors de leur hôte, sont également des hypothèses à considérer.

Ces résultats permettent toutefois d'imaginer un rôle des tapis dans la transmission des symbiontes de *B. azoricus*. Des larves de polychètes ont été observées à plusieurs reprises dans des tapis microbiens de zones de suintement froid (Omeregie et al., 2008) et il est légitime de penser que, de par leur structure et localisation, les tapis pourraient offrir un environnement favorable au maintien des larves et symbiontes autour des moulières, voire au développement des symbiontes sous forme libre. Les tapis pourraient ainsi faciliter l'acquisition rapide des symbiontes par les post-larves (Salerno et al., 2005), la recolonisation des bactériocytes après une période de diète (Kádár et al., 2005; Riou, 2009) et plus généralement participer à la maintenance locale des assemblages (Van Dover et al., 2001).

Nos résultats vont également dans le sens d'une transmission horizontale des deux types de symbiontes (Won et al., 2003).

Il a également été montré, que des espèces bactériennes pouvaient induire la fixation des larves de différents invertébrés marins (Huang and Hadfield, 2003; Lau et al., 2005). L'étude d'un éventuel impact des tapis sur la fixation des larves de modioles constituerait une perspective intéressante. Les tapis, souvent observés comme étant le premier colonisateur d'un site exposé au fluide, pourraient ainsi faciliter la colonisation postérieure de ce site par la macrofaune hydrothermale.

4.5. Dernières dispositions

Les travaux entrepris dans la cadre de ce travail de thèse constituent un premier apport à la connaissance des tapis microbiens de Lucky Strike ; ils doivent maintenant être poursuivis.

L'effort doit prioritairement être porté sur le volet cultural qui m'apparait comme un complément essentiel des inventaires moléculaires réalisés. Adapter les techniques de culture mises en place (cf. 4.1.3. et 4.1.4.) en vue de maintenir en culture – voire isoler – les bactéries filamenteuses participant de la formation des tapis microbiens, constituerait le premier et nécessaire point de cet effort. Réaliser une culture d'enrichissement des populations oxydant le méthane apporterait un contrepoint intéressant à l'étude menée sur les populations sulfo-oxydantes et pourrait également constituer, à mon sens, une étude à venir. Le fermenteur gas-lift pourrait, comme précédemment, être utilisé, avec pour milieu de culture une eau de mer synthétique dépourvue de matière organique et un flux gazeux permettant la méthanotrophie (CH_4 , O_2 , CO_2 et N_2).

Continuer l'exploration du possible rôle des tapis dans l'écologie des modioles et du reste de la faune hydrothermale constitue pour moi le deuxième point à traiter. Un échantillonnage raisonné de tapis sur les différents habitats de Tour Eiffel (cf. 1.5.4.) et d'autres sites, associé à une recherche et comptage des post-larves qu'ils abritent, apporterait des premiers éléments permettant d'étayer ou d'infirmer l'hypothèse postulée que les tapis aient un rôle de « nurserie ». La recherche des symbiontes de *B. azoricus* par hybridation fluorescente *in situ* est également à poursuivre.

Enfin, les nombreuses similitudes constatées entre tapis microbiens provenant de différents environnements chimiosynthétiques : similitudes en termes d'espèces mais aussi de métabolismes, laissent présager de l'intérêt des techniques de caractérisation donnant une vision plus globale, comme la pyroséquence, pour comparer les profils des tapis de différentes zones géographiques. Les reports successifs de la campagne BIG n'ont pas permis la comparaison des tapis de ce site avec ceux de Lucky Strike, comme il était initialement prévu de la faire dans le cadre de cette thèse. Cependant, la réalisation toute récente de cette campagne a permis l'échantillonnage de carottes de sédiments dans diverses zones, avec les tapis microbiens les surmontant parfois. Un travail de pyroséquence étant prévu au sein du laboratoire sur ces sédiments, je ne peux que souhaiter qu'il soit étendu aux tapis microbiens des pôles chauds et froids de ce site, ainsi qu'à différents échantillons de Lucky Strike.

5. Bibliographie

A

- Abrajano Jr, T., Murphy, D., Fang, J., Comet, P., and Brooks, J.** (1994) ratios in individual fatty acids of marine mytilids with and without bacterial symbionts. *Organic Geochemistry* **21**: 611-617.
- Alain, K., Olagnon, M., Desbruyeres, D., Page, A., Barbier, G., Juniper, S.K. et al.** (2002a) Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiology Ecology* **42**: 463-476.
- Alain, K., Pignet, P., Zbinden, M., Quillevere, M., Duchiron, F., Donval, J. et al.** (2002b) *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **52**: 1621.
- Alain, K., Rolland, S., Crassous, P., Lesongeur, F., Zbinden, M., Gall, C. et al.** (2003) *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles* **7**: 361-370.
- Alain, K., Postec, A., Grinsard, E., Lesongeur, F., Prieur, D., and Godfroy, A.** (2010) *Thermodesulfator atlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolitho-autotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **60**: 33.
- Alfreider, A., Vogt, C., Hoffmann, D., and Babel, W.** (2003) Diversity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from groundwater and aquifer microorganisms. *Microbial Ecology* **45**: 317-328.
- Amann, R., Krumholz, L., and Stahl, D.** (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**: 762.
- Angert, E., Northup, D., Reysenbach, A., Peek, A., Goebel, B., and Pace, N.** (1998) Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist* **83**: 1583.
- Anthony, C.** (1982) *The biochemistry of methylotrophs*: Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.
- Arakawa, S., Sato, T., Sato, R., Zhang, J., Gamo, T., Tsunogai, U. et al.** (2006) Molecular phylogenetic and chemical analyses of the microbial mats in deep-sea cold seep sediments at the northeastern Japan Sea. *Extremophiles* **10**: 311-319.
- Arenz, B., Held, B., Jurgens, J., Farrell, R., and Blanchette, R.** (2006) Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 3057-3064.

B

- Balch, W., Fox, G., Magrum, L., Woese, C., and Wolfe, R.** (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **43**: 260.
- Baross, J.A., and Deming, J.W.** (1985) The role of bacteria in the ecology of black-smoker environments. *Bulletin of the Biological Society of Washington*: 355-371.
- Bass, D., Howe, A., Brown, N., Barton, H., Demidova, M., Michelle, H. et al.** (2007) Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 3069.
- Bayne, B.** (1976) *Marine mussels, their ecology and physiology*: Cambridge University Press.
- Biscoito, M., Segonzac, M., Almeida, A., Desbruyeres, D., Geistdoerfer, P., Turnipseed, M., and Van Dover, C.** (2002) Fishes from the hydrothermal vents and cold seeps-An update. *CBM-Cahiers de Biologie Marine* **43**: 359-362.
- Blazejak, A., Kuever, J., Erseus, C., Amann, R., and Dubilier, N.** (2006) Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase

genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (*Oligochaeta*) from Bermuda and the Bahamas. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5527-5536.

Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A. et al. (2000a) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.

Borowski, W., Paull, C., and Ussler Iii, W. (1999) Global and local variations of interstitial sulfate gradients in deep-water, continental margin sediments: Sensitivity to underlying methane and gas hydrates. *Marine Geology* **159**: 131-154.

Boutet, I. (en préparation).

Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A., and Tiedje, J. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2096.

Brazelton, W.J., Sogin, M.L., and Baross, J.A. (2010) Multiple scales of diversification within natural populations of archaea in hydrothermal chimney biofilms. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 236-242.

Brazelton, W.J., Schrenk, M.O., Kelley, D.S., and Baross, J.A. (2006) Methane-and Sulfur-Metabolizing Microbial Communities Dominate the Lost City Hydrothermal Field Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6257-6270.

Brigmon, R., Furlong, M., and Whitman, W. (2003) Identification of *Thiothrix unzii* in two distinct ecosystems. *Letters in Applied Microbiology* **36**: 88-91.

Brusca, R. GJ, and Brusca, 2003. *Invertebrates (second edition): Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.*

Burgaud, G., Le Calvez, T., Arzur, D., Vandenkoornhuysse, P., and Barbier, G. (2009) Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology* **11**: 1588-1600.

Burgaud, G., Arzur, D., Durand, L., Cambon-Bonavita, M., and Barbier, G. (2010) Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents:

species richness and association with fauna. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 121-133.

Burggraf, S., Jannasch, H., Nicolaus, B., and Stetter, K. (1990) *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **13**: 24-28.

Burggraf, S., Stetter, K., Rouviere, P., and Woese, C. (1991) *Methanopyrus kandleri*: an archaeal methanogen unrelated to all other known methanogens. *Systematic and Applied Microbiology* **14**: 346.

Byrne, N. (2008) Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des sources hydrothermales. Sous la direction de Myriam Sibuet. Thèse de doctorat. Microbiologie. Université de Bretagne Occidentale : 2008.

Byrne, N., Lesongeur, F., Bienvenu, N., Geslin, C., Alain, K., Prieur, D., and Godfroy, A. (2009) Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor. *Extremophiles* **13**: 595-608.

Byrne, N., Strous, M., Cr, V., Kartal, B., Birrien, J.L., Schmid, M. et al. (2008) Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *The ISME Journal* **3**(1): 117-123.

C

Camp, C., and Sublette, K. (1992) Control of a *Thiobacillus denitrificans* bioreactor using machine vision. *Biotechnology and Bioengineering* **39**: 529-538.

Campbell, B.J., and Cary, S.C. (2004) Abundance of reverse tricarboxylic acid cycle genes in free-living microorganisms at deep-sea hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6282-6289.

Campbell, B.J., Stein, J.L., and Cary, S.C. (2003) Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5070-5078.

Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., and Takai, K. (2006) The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 458-468.

Carney, R. (1994) Consideration of the oasis analogy for chemosynthetic communities at Gulf of Mexico hydrocarbon vents. *Geo-Marine Letters* **14**: 149-159.

Cary, S., Cottrell, M., Stein, J., Camacho, F., and Desbruyeres, D. (1997) Molecular identification and localization of filamentous symbiotic bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1124.

Cavanaugh, C., and Robinson, J. (1995) Expression of Form I and Form II RuBisCO in chemoautotrophic symbioses: implications for the interpretation of stable carbon isotope values." *Limnology and Oceanography* **40**(8): 1496-1502.

Cavanaugh, C., Levering, P., Maki, J., Mitchell, R., and Lidstrom, M. (1987) Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* **325**, 346 - 348

Charlou, J., Donval, J., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P., and Holm, N. (2002) Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36° 14'N, MAR). *Chemical Geology* **191**: 345-359.

Chin, K., Sharma, M., Russell, L., O'Neill, K., and Lovley, D. (2008) Quantifying expression of a dissimilatory (bi) sulfite reductase gene in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Microbial Ecology* **55**: 489-499.

Corliss, J., and Ballard, R. (1977) Oases of life in the cold abyss. *National Geographic* **152**: 440-453.

Corre, E., Reysenbach, A.L., and Prieur, D. (2001) Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Letters* **205**: 329-335.

Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., and Lappin-Scott, H. (1995) Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology* **49**: 711-745.

Craddock, C., Hoeh, W., Gustafson, R., Lutz, R., Hashimoto, J., and Vrijenhoek, R. (1995) Evolutionary relationships among deep-sea mytilids (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal

vents and cold-water methane/sulfide seeps. *Marine Biology* **121**: 477-485.

Cuvelier, D., Sarrazin, J., Colaço, A., Copley, J., Desbruyères, D., Glover, A. et al. (2009) Distribution and spatial variation of hydrothermal faunal assemblages at Lucky Strike (Mid-Atlantic Ridge) revealed by high-resolution video image analysis. *Deep-Sea Research Part I* **56**: 2026-2040.

Cuvelier, D., Sarradin, P.M., Sarrazin, J., Colaço, A., Copley, J., Desbruyères, D. et al. (in press) Hydrothermal faunal assemblages and habitat characterization at the Atlantic Eiffel Tower edifice (Lucky Strike vent field).

Cvitkovitch, D. (2004) Genetic exchange in biofilms. *Microbial biofilms*: 192.

Cvitkovitch, D., Li, Y., and Ellen, R. (2003) Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *Journal of Clinical Investigation* **112**: 1626-1632.

Cytryn, E., Minz, D., Gieseke, A., and Rijn, J. (2006) Transient development of filamentous *Thiothrix* species in a marine sulfide oxidizing, denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Letters* **256**: 22-29.

D

Davis, R., and Moyer, C. (2008) Extreme spatial and temporal variability of hydrothermal microbial mat communities along the Mariana Island Arc and southern Mariana back-arc system. *Journal of Geophysical Research* **113**: B08S15.

De Busserolles, F., Sarrazin, J., Gauthier, O., Gélinas, Y., Fabri, M., Sarradin, P., and Desbruyères, D. (2009) Are spatial variations in the diets of hydrothermal fauna linked to local environmental conditions? *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **56**(19-20): 1649-1664..

Decho, A. (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments—their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanographic Marine Biology* **28**: 73-153.

Dedysh, S., Liesack, W., Khmelenina, V., Suzina, N., Trotsenko, Y., Semrau, J. et al. (2000) *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new

methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 955.

Degens, E. (1974) Synthesis of organic matter in the presence of silicate and lime. *Chemical Geology* **13**: 1-10.

Desbruyères, D., Almeida, A., Biscoito, M., Comtet, T., Khripounoff, A., Le Bris, N. et al. (2000) A review of the distribution of hydrothermal vent communities along the northern Mid-Atlantic Ridge: dispersal vs. environmental controls. *Hydrobiologia* **440**: 201-216.

Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J.-C., Colaço, A., Comtet, T., Crassous, T. et al. (2001) Variations in deep-sea hydrothermal vents communities on the Mid-Atlantic-Ridge near the Azores plateau. *Deep-Sea Research I* **48**: 1325-1346.

Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., and Teske, A. (2005) Methanogen Diversity Evidenced by Molecular Characterization of Methyl Coenzyme M Reductase A (mcrA) Genes in Hydrothermal Sediments of the Guaymas Basin. *Applied Environmental Microbiology* **71**: 4592-4601.

Distel, D., and Cavanaugh, C. (1994) Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *Journal of Bacteriology* **176**: 1932.

Distel, D.L., Lane, D.J., Olsen, G.J., Giovannoni, S.J., Pace, B., Pace, N.R. et al. (1988) Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. *Journal of Bacteriology* **170**: 2506-2510.

Donlan, R. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emergent Infectious Disease*. 2002 September; **8**(9): 881-890.

Dorigo, U., Volatier, L., and Humbert, J. (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* **39**: 2207-2218.

Douville, E., Charlou, J., Oelkers, E., Bienvenu, P., Jove Colon, C., Donval, J. et al. (2002) The rainbow vent fluids (36 14'N, MAR): the influence

of ultramafic rocks and phase separation on trace metal content in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fluids. *Chemical Geology* **184**: 37-48.

Dubilier, N., Windoffer, R., and Giere, O. (1998) Ultrastructure and stable carbon isotope composition of the hydrothermal vent mussels *Bathymodiolus brevior* and *B. sp. affinis brevior* from the North Fiji Basin, western Pacific. *Marine Ecology Progress Series* **165**: 187-193.

Dubilier, N., Bergin, C., and Lott, C. (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 725-740.

Duperron, S. (2005) Symbioses bactériennes de bivalves mytilidés associés aux sources de fluides en domaine océanique profond : diversité, rôle nutritionnel et influence de l'environnement. Sous la direction de Myriam Sibuet. Thèse de doctorat. Biologie, Ecologie. Université Paris 6: 2005.

Duperron, S., Halary, S., Lorion, J., Sibuet, M., and Gaill, F. (2008) Unexpected co-occurrence of six bacterial symbionts in the gills of the cold seep mussel *Idas sp.* (Bivalvia: Mytilidae). *Environmental Microbiology* **10**: 433-445.

Duperron, S., Sibuet, M., MacGregor, B.J., Kuypers, M.M.M., Fisher, C.R., and Dubilier, N. (2007) Diversity, relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico. *Environmental Microbiology* **9**: 1423-1438.

Duperron, S., Nadalig, T., Caprais, J.-C., Sibuet, M., Fiala-Medioni, A., Amann, R., and Dubilier, N. (2005) Dual Symbiosis in a *Bathymodiolus sp.* Mussel from a Methane Seep on the Gabon Continental Margin (Southeast Atlantic): 16S rRNA Phylogeny and Distribution of the Symbionts in Gills. *Applied Environmental Microbiology* **71**: 1694-1700.

Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, A., Pernthaler, A., McKiness, Z.P. et al. (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia : Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* **8**: 1441-1447.

Durand, L., Zbinden, M., Cueff-Gauchard, V., Duperron, S., Roussel, E., Shillito, B., and Cambon-Bonavita, M. (2010) Microbial diversity associated with the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* gut and occurrence of a resident microbial community. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 291-303.

E

Edgcomb, V.P., Kysela, D.T., Teske, A., Gomez, A.D., and Sogin, M.L. (2002) Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7658-7662.

Edmond, J.M., Von Damm, K.L., McDuff, R.E., and Measures, C.I. (1982) Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal. *Nature* **297**: 187-191.

Edwards, K., Rogers, D., Wirsen, C., and McCollom, T. (2003) Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic {alpha}- and {gamma}-Proteobacteria from the deep sea. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2906.

Elsaied, H., and Naganuma, T. (2001) Phylogenetic Diversity of Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large-Subunit Genes from Deep-Sea Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1751-1765.

Elsaied, H.E., Kimura, H., and Naganuma, T. (2007) Composition of archaeal, bacterial, and eukaryal RuBisCO genotypes in three Western Pacific arc hydrothermal vent systems. *Extremophiles* **11**: 191-202.

Emerson, D., and Moyer, C.L. (2002) Neutrophilic Fe-Oxidizing Bacteria Are Abundant at the Loihi Seamount Hydrothermal Vents and Play a Major Role in Fe Oxide Deposition. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3085-3093.

Endow, K., and Ohta, S. (1989) The symbiotic relationship between bacteria and a mesogastropod snail, *Alviniconcha hessleri*, collected from hydrothermal vents of the Mariana

Back-Arc Basin. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology* **3**: 73-82.

Engel, A., Porter, M., Kinkle, B., and Kane, T. (2001) Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia. *Geomicrobiology Journal* **18**: 259-274.

Engel, A.S., Porter, M.L., Stern, L.A., Quinlan, S., and Bennett, P.C. (2004) Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic "Epsilonproteobacteria". *FEMS Microbiology Ecology* **51**: 31-53.

Engel, A.S., Lee, N., Porter, M.L., Stern, L.A., Bennett, P.C., and Wagner, M. (2003) Filamentous "Epsilonproteobacteria" Dominate Microbial Mats from Sulfidic Cave Springs. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5503-5511.

Erauso, G. (1994) Les Thermococcales du bassin Nord-Fidjien, description d'une nouvelle espèce: *Pyrococcus abyssi* et caractérisation de son plasmide. Thèse de Doctorat en océanologie biologique, Université de Bretagne Occidentale. 1994.

F

Fenchel, T., and Bernard, C. (1995) Mats of colourless sulphur bacteria. I. Major microbial processes. *Marine ecology progress series Oldendorf* **128**: 161-170.

Fiala-Medioni, A., Alayse, A., and Cahet, G. (1986) Evidence of in situ uptake and incorporation of bicarbonate and amino acids by a hydrothermal vent mussel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **96**: 191-198.

Fiala-Médioni, A., Métivier, C., Herry, A., and Pennec, M. (1986) Ultrastructure of the gill of the hydrothermal-vent mytilid *Bathymodiolus* sp. *Marine Biology* **92**: 65-72.

Fisher, C. (1988) Microhabitat variation in the hydrothermal vent mussel, *Bathymodiolus thermophilus*, at the Rose Garden vent on the Galapagos Rift. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research* **35**: 1769-1791.

Fisher, C. (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Review of Aquatic Sciences* **2**.

Fouquet, Y., Auclair, G., Cambon, P., and Etoubleau, J. (1988) Geological setting and mineralogical and geochemical investigations on sulfide deposits near 13 N on the East Pacific Rise. *Marine Geology* **84**: 145-178.

Fouquet, Y., Charlou, J., Ondréas, H., Radford-Knoery, J., Donval, J., Douville, E. et al. (1997) Discovery and first submersible investigations on the Rainbow Hydrothermal Field on the MAR (36 14 N). *Cosmos Report* **78**: 832.

Francis, C.A., Beman, J.M., and Kuypers, M.M.M. (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME* **1**: 19-27.

Fricke, H., Giere, O., Stetter, K., Alfredsson, G., Kristjansson, J., Stoffers, P., and Svavarsson, J. (1989) Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar Mid-Atlantic ridge. *Marine Biology* **102**: 425-429.

Fujiwara, Y., Takai, K., Uematsu, K., Tsuchida, S., Hunt, J., and Hashimoto, J. (2000) Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distributions. *Marine Ecology Progress Series* **208**: 147-155.

Fuse, H., Ohta, M., Takimura, O., Murakami, K., Inoue, H., Yamaoka, Y. et al. (1998) Oxidation of trichloroethylene and dimethyl sulfide by a marine *Methylomicrobium* strain containing soluble methane monooxygenase. *Bioscience, biotechnology, and Biochemistry* **62**: 1925-1931.

G

Gadanhó, M., and Sampaio, J. (2005) Occurrence and diversity of yeasts in the mid-Atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. *Microbial ecology* **50**: 408-417.

Gage, J., and Tyler, P. (1991) *Deep-sea biology*: Cambridge University Press Cambridge.

Gaill, F., Desbruyeres, D., and Prieur, D. (1987) Bacterial communities associated with "Pompeii worms" from the East Pacific Rise hydrothermal

vents: SEM, TEM observations. *Microbial Ecology* **13**: 129-139.

Gerasimchuk, A.L., Shatalov, A.A., Novikov, A.L., Butorova, O.P., Pimenov, N.V., Lein, A.Y. et al. (2010) The search for sulfate-reducing bacteria in mat samples from the lost city hydrothermal field by molecular cloning. *Microbiology* **79**: 96-105.

Gilhooly, W.P., Carney, R.S., and Macko, S.A. (2007) Relationships between sulfide-oxidizing bacterial mats and their carbon sources in northern Gulf of Mexico cold seeps. *Organic Geochemistry* **38**: 380-393.

Godfroy, A., Postec, A., and Raven, N. (2006b) 4 Growth of Hyperthermophilic Microorganisms for Physiological and Nutritional Studies. *Methods in Microbiology* **35**: 93-108.

Gold, T. (1992) The Deep, Hot Biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 6045-6049.

Gotz, D., Banta, A., Beveridge, T., Rushdi, A., Simoneit, B., and Reysenbach, A. (2002) *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1349.

Grabovich, M.Y., Patrinskaya, V.Y., Muntyan, M.S., and Dubinina, G.A. (2001) Lithoautotrophic growth of the freshwater strain *Beggiatoa* D-402 and energy conservation in a homogeneous culture under microoxic conditions. *FEMS Microbiology Letters* **204**: 341-345.

Grunke, S., Lichtschlag, A., de Beer, D., Kuypers, M., Losekann-Behrens, T., Ramette, A., and Boetius, A. (2010) Novel observations of *Thiobacterium*, a sulfur-storing Gamma-proteobacterium producing gelatinous mats. *ISME Journal* **4**: 1031-1043.

H

Hafenbradl, D., Keller, M., Dirmeier, R., Rachel, R., Roßnagel, P., Burggraf, S. et al. (1996) *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at

neutral pH under anoxic conditions. *Archives of microbiology* **166**: 308-314.

Hagen, K.D., and Nelson, D.C. (1996) Organic carbon utilization by obligately and facultatively autotrophic *Beggiatoa* strains in homogeneous and gradient cultures. *Applied Environmental Microbiology* **62**: 947-953.

Halary, S., Riou, V., Gaill, F., Boudier, T., and Duperron, S. (2008) 3D FISH for the quantification of methane- and sulphur-oxidizing endosymbionts in bacteriocytes of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *ISME Journal* **2**: 284-292.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 95-108.

Haygood, M. (1996) The potential role of functional differences between Rubisco forms in governing expression in chemoautotrophic symbioses. *Limnology and Oceanography* **41**: 370-371.

Heijs, S.K., Damste, J.S.S., and Forney, L.J. (2005) Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Ecology* **54**: 47-56.

Henry, P., and Boulrange, S. (2004) Smectite and fluid budget at Nankai ODP sites derived from cation exchange capacity. *Earth and Planetary Science Letters* **219**: 129-145.

Heukelekian, H., and Heller, A. (1940) Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of bacteriology* **40**: 547.

Hipp, W.M., Pott, A.S., ThumSchmitz, N., Faath, I., Dahl, C., and Truper, H.G. (1997) Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology-Uk* **143**: 2891-2902.

Hirayama, H., Sunamura, M., Takai, K., Nunoura, T., Noguchi, T., Oida, H. et al. (2007) Culture-Dependent and -Independent Characterization of Microbial Communities Associated with a Shallow Submarine Hydrothermal System Occurring within a Coral Reef off Taketomi Island, Japan. *Applied Environmental Microbiology* **73**: 7642-7656.

Hoaki, T., Nishijima, M., Miyashita, H., and Maruyama, T. (1995) Dense community of

hyperthermophilic sulfur-dependent heterotrophs in a geothermally heated shallow submarine biotope near Kodakara-Jima Island, Kagoshima, Japan. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1931.

Holm, N., and Charlou, J. (2001) Initial indications of abiogenic formation of hydrocarbons in the Rainbow ultramafic hydrothermal system, Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* **191**: 1-8.

Holmes, A.J., Costello, A., Lidstrom, M.E., and Murrell, J.C. (1995) Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiology Letters* **132**: 203-208.

Hovland, M. (2002) On the self-sealing nature of marine seeps. *Continental Shelf Research* **22**: 2387-2394.

Hovland, M., Gardner, J., and Judd, A. (2002) The significance of pockmarks to understanding fluid flow processes and geohazards. *Geofluids* **2**: 127-136.

Hovland, M., Svensen, H., Forsberg, C., Johansen, H., Fichler, C., Fosså, J. et al. (2005) Complex pockmarks with carbonate-ridges off mid-Norway: Products of sediment degassing. *Marine Geology* **218**: 191-206.

Hoyle, B., Alcantara, J., and Costerton, J. (1992) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**: 2054.

Huang, S., and Hadfield, M. (2003) Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Ecology Progress Series* **260**: 161-172.

Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyschkony, I., Rachel, R., and Stetter, K. (2000) *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 2093.

Huber, H., Hohn, M., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V., and Stetter, K. (2002a) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.

Huber, J., Butterfield, D., and Baross, J. (2003) Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiology Ecology* **43**: 393-409.

Huber, J.A., Butterfield, D.A., and Baross, J.A. (2002b) Temporal Changes in Archaeal Diversity and Chemistry in a Mid-Ocean Ridge Subseafloor Habitat. *Applied Environmental Microbiology* **68**: 1585-1594.

J

Jacq, E., Prieur, D., Nichols, P., White, D., Porter, T., and Geesey, G. (1989) Microscopic examination and fatty acid characterization of filamentous bacteria colonizing substrata around subtidal hydrothermal vents. *Archives of Microbiology* **152**: 64-71.

Jahnke, L., Summons, R., Dowling, L., and Zahiralis, K. (1995) Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills: chemical and isotopic analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 576.

Jannasch, H., and Wirsén, C. (1981) Morphological survey of microbial mats near deep-sea thermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* **41**: 528.

Jannasch, H., and Nelson, D. (1984) Recent Progress in the Microbiology of Hydrothermal Vents. In: *Amer Society for Microbiology*, p. 170.

Jannasch, H.W., and Wirsén, C.O. (1979) Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *BioScience* **29**: 592-598.

Jannasch, H.W., and Mottl, M.J. (1985) Geomicrobiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Science* **229**: 717-725.

Jannasch, H.W., Nelson, D.C., and Wirsén, C.O. (1989) Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa*) at hydrothermal vent site. *Nature* **342**: 834-836.

Jeanthon, C., L'Haridon, S., Reysenbach, A., Vernet, M., Messner, P., Sleytr, U., and Prieur, D. (1998) *Methanococcus infernus* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **48**: 913.

Jeanthon, C., L'Haridon, S., Reysenbach, A., Corre, E., Vernet, M., Messner, P. et al. (1999) *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213Tas *Methanococcus fervens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**: 583.

Jefferson, K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* **236**: 163-173.

Jensen, E., Kharazmi, A., Lam, K., Costerton, J., and Hoiby, N. (1990) Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infection and Immunity* **58**: 2383.

Johnson, K., Childress, J., Beehler, C., and Sakamoto, C. (1994) Biogeochemistry of hydrothermal vent mussel communities: the deep-sea analogue to the intertidal zone. *Deep Sea Research (Part I, Oceanographic Research Papers)* **41**: 993-1011.

Jones, H., Roth, I., and Sanders III, W. (1969) Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of bacteriology* **99**: 316.

Jones, W., Leigh, J., Mayer, F., Woese, C., and Wolfe, R. (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology* **136**: 254-261.

Juniper, S., and Sibuet, M. (1987) Cold seep benthic communities in Japan subduction zones: Spatial organization, trophic strategies and evidence for temporal evolution. *Marine ecology progress series Oldendorf* **40**: 115-126.

K

Kádár, E., Bettencourt, R., Costa, V., Santos, R., Lobo-da-Cunha, A., and Dando, P. (2005) Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **318**: 99-110.

Kalanetra, K.M., Huston, S.L., and Nelson, D.C. (2004) Novel, Attached, Sulfur-Oxidizing Bacteria at Shallow Hydrothermal Vents Possess Vacuoles Not Involved in Respiratory Nitrate Accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7487-7496.

Karl, D. (1980) Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **44**: 739.

Karl, D.M. (1995) Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities. *The Microbiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*: 35-124.

Kato, S., Kobayashi, C., Kakegawa, T., and Yamagishi, A. (2009) Microbial communities in iron-silica-rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental Microbiology* **11**: 2094-2111.

Kelly, D., Shergill, J., Lu, W., and Wood, A. (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 95-107.

Kenk, V.C., and Wilson, B.R. (1985) A new mussel (*Bivalvia: Mytilidae*) from hydrothermal vents in the Galapagos Rift zone. *Malacologia*, **26**: 253-271.

Kirchman, D. (2002) The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* **39**: 91-100.

Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Lochte, K., Pfannkuche, O. et al. (2003) Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiology Journal* **20**: 269-294.

Kochevar, R., Childress, J., Fisher, C., and Minnich, E. (1992) The methane mussel: roles of symbiont and host in the metabolic utilization of methane. *Marine Biology* **112**: 389-401.

Kolenbrander, P., and Palmer Jr, R. (2004) Human oral bacterial biofilms. *Microbial biofilms*: 85-117.

Kolganova, T., Kuznetsov, B., and Tourova, T. (2002) Designing and testing oligonucleotide primers for amplification and sequencing of

archaeal 16S rRNA genes. *Microbiology* **71**: 243-246.

Konneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.

Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*.

L

L'Haridon, S., Cilia, V., Messner, P., Raguenes, G., Gambacorta, A., Sleytr, U. et al. (1998) *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 701.

L'Haridon, S., Reysenbach, A., Tindall, B., Schonheit, P., Banta, A., Johnsen, U. et al. (2006) *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermovibrio guaymasensis* sp. nov., three thermophilic members of the *Desulfurobacteriaceae* fam. nov., a deep branching lineage within the Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2843.

Lam, P., Cowen, J., and Jones, R. (2004) Autothotrophic ammonia oxidation in a deep sea hydrothermal plume. *FEMS Microbiology Ecology* **47**: 191-206.

Lamfon, H., Al-Karaawi, Z., McCullough, M., Porter, S., and Pratten, J. (2005) Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiology Letters* **242**: 345-351.

Lane, D. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* **1**: 115-176.

Lane, D., Pace, B., Olsen, G., Stahl, D., Sogin, M., and Pace, N. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**: 6955-6659.

Larkin, J., Henk, M., and Aharon, P. (1994) *Beggiatoa* in microbial mats at hydrocarbon vents in the Gulf of Mexico and Warm Mineral Springs, Florida. *Geo-Marine Letters* **14**: 97-103.

Larkin, J.M., and Henk, M.C. (1996) Filamentous sulfide-oxidizing bacteria at hydrocarbon seep of the gulf of Mexico. *Microscopy Research and Technique* **33**: 23-31.

Lau, S., Thiyagarajan, V., Cheung, S., and Qian, P. (2005) Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquatic Microbial Ecology* **38**: 41-51.

Lazar, C. (2009) Diversité et activité des communautés microbiennes dans des sédiments marins associés aux émissions de fluides froids. Sous la direction de Laurent Toffin. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Bretagne Occidentale.

Le Calvez, T. (2009) Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. Sous la direction de Philippe Vandenkoornhuysse. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Rennes 1.

Le Calvez, T., Burgaud, G., Mahe, S., Barbier, G., and Vandenkoornhuysse, P. (2009) Fungal Diversity in Deep-Sea Hydrothermal Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 6415-6421.

Le Magrex-Debar, E., Lemoine, J., Gellé, M., Jacquelin, L., and Choisy, C. (2000) Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *International journal of food microbiology* **55**: 239-243.

Lee Van Dover, C., Desbruyères, D., Segonzac, M., Comtet, T., Saldanha, L., Fiala-Medioni, A., and Langmuir, C. (1996) Biology of the Lucky Strike hydrothermal field. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **43**: 1509-1529.

Levin, L., and Mendoza, G. (2007) Community structure and nutrition of deep methane-seep macrobenthos from the North Pacific (Aleutian Margin and the Gulf of Mexico (Florida Escarpment)). *Marine Ecology* **28**: 131-151.

Lin, X., Wakeham, S., Putnam, I., Astor, Y., Scranton, M., Chistoserdov, A., and Taylor, G. (2006) Comparison of vertical distributions of

prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black Sea by use of fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2679.

Lloyd, K., Albert, D., Biddle, J., Chanton, J., Pizarro, O., and Teske, A. (2010) Spatial Structure and Activity of Sedimentary Microbial Communities Underlying a *Beggiatoa* spp. Mat in a Gulf of Mexico Hydrocarbon Seep. *PloS one* **5**(1): 1-13.

Longnecker, K., and Reysenbach, A.-L. (2001) Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of [epsi]-Proteobacteria to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiology Ecology* **35**: 287-293.

Lonsdale, P. (1977) Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Research* **24**: 857-858.

Lopez-Garcia, P., Gaill, F., and Moreira, D. (2002) Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environmental Microbiology* **4**: 204-215.

Lopez-Garcia, P., Duperron, S., Philippot, P., Foriel, J., Susini, J., and Moreira, D. (2003) Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilon proteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* **5**: 961-976.

Lovley, D., Holmes, D., and Nevin, K. (2004) Dissimilatory fe (iii) and mn (iv) reduction. *Advances in Microbial Physiology* **49**: 219-286.

M

Maas, P., O'Mullan, G., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1999) Genetic and morphometric characterization of mussels (*Bivalvia: Mytilidae*) from Mid-Atlantic hydrothermal vents. *The Biological Bulletin* **196**: 265.

Macalady, J., Lyon, E., Koffman, B., Albertson, L., Meyer, K., Galdenzi, S., and Mariani, S. (2006) Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5596.

- MacAvoy, S., Macko, S., and Joye, S.** (2002) Fatty acid carbon isotope signatures in chemosynthetic mussels and tube worms from Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities. *Chemical Geology* **185**: 1-8.
- Madigan, M., Martinko, J., and Parker, J.** (2002) Brock Biology of Microorganisms. 10th. In: Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., and Clark, D.** (2008) Brock Biology of microorganisms 12th edn. *International Microbiology* **11**: 65-73.
- Mah, T., and O'Toole, G.** (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* **9**: 34-39.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., and Schleifer, K.** (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* **142**: 1097.
- Martins, I., Colaço, A., Santos, R., Lesongeur, F., Godfroy, A., Sarradin, P., and Cosson, R.** (2009) Relationship between the occurrence of filamentous bacteria on *Bathymodiolus azoricus* shell and the physiological and toxicological status of the vent mussel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **376**: 1-6.
- Mattison, R.G., Abbiati, M., Dando, P.R., Fitzsimons, M.F., Pratt, S.M., Southward, A.J., and Southward, E.C.** (1998) Chemoautotrophic microbial mats in submarine caves with hydrothermal sulphidic springs at Cape Palinuro, Italy. *Microbial Ecology* **35**: 58-71.
- Mehta, M., Butterfield, D., and Baross, J.** (2003) Phylogenetic diversity of nitrogenase (nifH) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 960.
- Meyer, B., and Kuever, J.** (2007a) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (aprBA) among sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* **153**: 3478-3498.
- Meyer, B., and Kuever, J.** (2007b) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**: 2026-2044.
- Meyer, B., and Kuever, J.** (2007c) Molecular Analysis of the Diversity of Sulfate-Reducing and Sulfur-Oxidizing Prokaryotes in the Environment, Using aprA as Functional Marker Gene. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 7664-7679.
- Meyer, B., Imhoff, J.F., and Kuever, J.** (2007) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the soxB gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environmental Microbiology* **9**: 2957-2977.
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M. et al.** (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**: 1013.
- Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., and Sobczyk, P.A.** (2004) Identification of Members of the Metabolically Active Microbial Populations Associated with *Beggiatoa* Species Mat Communities from Gulf of Mexico Cold-Seep Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5447-5458.
- Miroshnichenko, M., l'Haridon, S., Nercessian, O., Antipov, A., Kostrikina, N., Tindall, B. et al.** (2003) *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Thermaceae* from a deep-sea hot vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1143.
- Molin, S., and Tolker-Nielsen, T.** (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 255-261.
- Moran, J., Beal, E., Vrentas, J., Orphan, V., Freeman, K., and House, C.** (2008) Methyl sulfides as intermediates in the anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology* **10**: 162-173.
- Mori, K., Sunamura, M., Yanagawa, K., Ishibashi, J., Miyoshi, Y., Iino, T. et al.** (2008) First cultivation and ecological investigation of a bacterium affiliated with the candidate phylum OP5 from hot springs. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 6223-6229.

Morita, R. (1999) Is H₂ the Universal Energy Source for Long-Term Survival? *Microbial Ecology* **38**: 307-320.

Moussard, H., Corre, E., Cambon Bonavita, M.A., Fouquet, Y., and Jeanthon, C. (2006) Novel uncultured *Epsilonproteobacteria* dominate a filamentous sulphur mat from the 13 degrees N hydrothermal vent field, East Pacific Rise. *FEMS Microbiology Ecology* **58**: 449-463.

Moyer, C., Dobbs, F., and Karl, D. (1995) Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1555-1562.

Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M. (1994) Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 871-879.

Moyer, C.L., Tiedje, J.M., Dobbs, F.C., and Karl, D.M. (1998) Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **45**: 303-317.

Muller, F., Brissac, T., Le Bris, N., Felbeck, H., and Gros, O. (2010) First description of giant Archaea (*Thaumarchaeota*) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. *Environmental Microbiology* **12**: 2371-2383.

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

N

Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K., and Sako, Y. (2003) *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53**: 863.

Nakagawa, Y., and Yamasato, K. (1993) Phylogenetic diversity of the genus *Cytophaga* revealed by 16S rRNA sequencing and menaquinone analysis. *Microbiology* **139**: 1155.

Nealson, K.H. (1997) Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **25**: 403-434.

Nelson, D., and Castenholz, R. (1981) Use of reduced sulfur compounds by *Beggiatoa* sp. *Journal of Bacteriology* **147**: 140.

Nelson, D.C., and Jannasch, H.G. (1983) Chemoautotrophic growth of marine *Beggiatoa* in sulfides gradient cultures. *Arch Microbiol* **136**: 262-269.

Nelson, D.C., Revsbech, N.P., and Jørgensen, B.B. (1986) Microoxic-Anoxic Niche of *Beggiatoa* spp.: Microelectrode Survey of Marine and Freshwater Strains. *Appl Environ Microbiol* **52**: 161-168.

Nelson, D.C., Wirsén, C.O., and Jannasch, H.W. (1989) Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa* sp. abundant at hydrothermal vent of Guayamas basin. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2909-2917.

Nercessian, O., Reysenbach, A., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2003) Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 N). *Environmental Microbiology* **5**: 492-502.

Nercessian, O., Prokofeva, M., Lebedinski, A., L'Haridon, S., Cary, C., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2004) Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for detecting cultured and uncultured archaeal lineages in high-temperature environments. *Environmental Microbiology* **6**: 170-182.

Nikolaus, R., Ammerman, J., and MacDonald, I. (2003) Distinct pigmentation and trophic modes in *Beggiatoa* from hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico. *Aquatic Microbial Ecology* **32**: 85-93.

Northup, D., and Lavoie, K. (2001) Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal* **18**: 199-222.

O

O'Mullan, G., Maas, P., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (2001) A hybrid zone between hydrothermal vent mussels (*Bivalvia: Mytilidae*) from the Mid-Atlantic Ridge. *Molecular Ecology* **10**: 2819-2831.

Omeregge, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Roy, H. et al. (2008) Biogeochemistry and community composition of iron- and sulfur-precipitating microbial mats at the Chefren mud volcano (Nile Deep Sea fan, Eastern Mediterranean). *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3198-3215.

Ondreas, H., Cannat, M., Fouquet, Y., Normand, A., Sarradin, P., and Sarrazin, J. (2009) Recent volcanic events and the distribution of hydrothermal venting at the Lucky Strike hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge. *Geochemistry Geophysics Geosystems* **10**: 1-18.

Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., and Joye, S. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **69**: 4267-4281.

Orphan, V., and Ussler, W. (2004) Geological, geochemical, and microbiological heterogeneity of the seafloor around methane vents in the Eel River Basin, offshore California. *Chemical Geology* **205**: 265-289.

Orphan, V.J., Hinrichs, K.U., Ussler, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P. et al. (2001) Comparative Analysis of Methane-Oxidizing *Archaea* and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1922-1934.

P

Page, H.M., Fialamedioni, A., Fisher, C.R., and Childress, J.J. (1991) Experimental-Evidence for Filter-Feeding by the Hydrothermal Vent Mussel, *Bathymodiolus-Thermophilus*. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers* **38**: 1455-1461.

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

Palacios, C., Zbinden, M., Baco, A., Treude, T., Smith, C., Gaill, F. et al. (2006) Microbial ecology of deep-sea sunken wood: quantitative measurements of bacterial biomass and cellulolytic activities. *Cahier Biologie Marine* **47**: 415-420.

Palleroni, N.J. (1997) Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 3-19.

Partensky, F., Blanchot, J., and Vaulot, D. (1999) Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, Numéro Spécial*: 457-476.

Paull, C., Hecker, B., Commeau, R., Freeman-Lynde, R., Neumann, C., Corso, W. et al. (1984) Biological communities at the Florida Escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science* **226**: 965.

Pernthaler, A., and Amann, R. (2004) Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5426-5433.

Petri, R., Podgorsek, L., and Imhoff, J.F. (2001) Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **197**: 171-178.

Pikuta, E., Lysenko, A., Suzina, N., Osipov, G., Kuznetsov, B., Tourova, T. et al. (2000) *Desulfotomaculum alkaliphilum* sp. nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 25.

Pile, A., and Young, C. (1999) Plankton availability and retention efficiencies of cold-seep symbiotic mussels. *Limnology and Oceanography* **44**: 1833-1839.

Polz, M.F., and Cavanaugh, C.M. (1995) Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-

Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 7232-7236.

Pond, D., Bell, M., Dixon, D., Fallick, A., Segonzac, M., and Sargent, J. (1998) Stable-carbon-isotope composition of fatty acids in hydrothermal vent mussels containing methanotrophic and thiotrophic bacterial endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 370.

Postec, A., Urios, L., Lesongeur, F., Ollivier, B., Querellou, J., and Godfroy, A. (2005a) Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting deep-sea hydrothermal ecosystems. *Current microbiology* **50**: 138-144.

Postec, A., Pignet, P., Cueff-Gauchard, V., Schmitt, A., Querellou, J., and Godfroy, A. (2005b) Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media. *Research in Microbiology* **156**: 82-87.

Postec, A., Lesongeur, F., Pignet, P., Ollivier, B., Querellou, J., and Godfroy, A. (2007) Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles* **11**: 747-757.

Postec, A., Breton, C., Fardeau, M., Lesongeur, F., Pignet, P., Querellou, J. et al. (2005c) *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov., a novel member of the order Thermotogales isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1217.

Poulson, T., and Lavoie, K. (2000) The trophic basis of subsurface ecosystems. (Eds H Wilkens, DC Culver, WF Humphreys) pp. 231-249, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.

Prieur, D. (1997) Microbiology of deep-sea hydrothermal vents. *Trends in Biotechnology* **15**: 242-244.

Prieur, D. (1998) un enfer très fécond: Des formes de vie insolites. *Biofutur (Puteaux)*: 25-27.

Prosser, J. (2002) Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil* **244**: 9-17.

R

Rabus, R., Hansen, T., and Widdel, F. (2006) Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. *The Prokaryotes* **2**: 659-768.

Rassa, A., McAllister, S., Safran, S., and Moyer, C. (2009) *Zeta-Proteobacteria* Dominate the Colonization and Formation of Microbial Mats in Low-Temperature Hydrothermal Vents at Loihi Seamount, Hawaii. *Geomicrobiology Journal* **26**: 623-638.

Raulfs, E., Macko, S., and Van Dover, C. (2004) Tissue and symbiont condition of mussels (*Bathymodiulus thermophilus*) exposed to varying levels of hydrothermal activity. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **84**: 229-234.

Raven, N., Ladwa, N., and Sharp, R. (1992a) Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied and Environmental Microbiology* **38**: 263-267.

Raven, N., Ladwa, N., Cossar, D., and Sharp, R. (1992b) Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**: 263-267.

Raven, N., Cossar, J., Ladwa, N., and Sharp, R. (1997) Process for the production of thermophilic microorganisms in high yield. In: Google Patents.

Reysenbach, A.L., Longnecker, K., and Kirshtein, J. (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3798-3806.

Riou, V. (2009) Nutritional plasticity in a deep-sea dualendosymbiotic suspension feeding mussel: *Bathymodiulus azoricus* from MAR hydrothermal vents. Thèse de doctorat en Biologie/Écologie. Vrije Universiteit Brussel - Universidade dos Açores.

Rothschild, L., and Mancinelli, R. (2001) Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092-1101.

Roussel, E.G., Bonavita, M.A.C., Querellou, J., Cragg, B.A., Webster, G., Prieur, D., and Parkes, R.J. (2008) Extending the Sub-Sea-Floor Biosphere. *Science* **320**: 1046.

S

- Sager, W., MacDonald, I., and Hou, R.** (2003) Geophysical signatures of mud mounds at hydrocarbon seeps on the Louisiana continental slope, northern Gulf of Mexico. *Marine Geology* **198**: 97-132.
- Sahling, H., Rickert, D., Lee, R., Linke, P., and Suess, E.** (2002) Macrofaunal community structure and sulfide flux at gas hydrate deposits from the Cascadia convergent margin, NE Pacific. *Marine Ecology Progress Series* **231**: 121-138.
- Saldanha, L., and Biscoito, M.** (1997) Fishes from the Lucky Strike and Menez Gwen hydrothermal vent sites (Mid-Atlantic Ridge). *Boletim do Museu Municipal do Funchal* **49**: 189-206.
- Salerno, J.L., Macko, S.A., Hallam, S.J., Bright, M., Won, Y.J., McKiness, Z., and Van Dover, C.L.** (2005) Characterization of symbiont populations in life-history stages of mussels from chemosynthetic environments. *Biological Bulletin* **208**: 145-155.
- Santelli, C., Orcutt, B., Banning, E., Bach, W., Moyer, C., Sogin, M. et al.** (2008) Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* **453**: 653-656.
- Sarbu, S., Kane, T., and Kinkle, B.** (1996) A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science* **272**: 1953.
- Sarradin, P.-M., Caprais, J.-C., Riso, R., Kerouel, R., and Aminot, A.** (1999) Chemical environment of the hydrothermal mussel communities in the Lucky Strike and Menez Gwen vent fields, Mid Atlantic Ridge. *Cahier de Biologie Marine* **40**: 93-104.
- Sarradin, P., Waeles, M., Bernagout, S., Le Gall, C., Sarrazin, J., and Riso, R.** (2009) Speciation of dissolved copper within an active hydrothermal edifice on the Lucky Strike vent field (MAR, 37° N). *Science of the Total Environment* **407**: 869-878.
- Sarrazin, J., and Juniper, S.** (1999) Biological characteristics of a hydrothermal edifice mosaic community. *Marine Ecology Progress Series* **185**: 1-19.
- Sarrazin, J., Robigou, V., Juniper, S., and Delaney, J.** (1997) Biological and geological dynamics over four years on a high-temperature sulfide structure at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal observatory. *Marine ecology Progress Series* **153**: 5-24.
- Sarrazin, J., Juniper, S., Massoth, G., and Legendre, P.** (1999) Physical and chemical factors influencing species distributions on hydrothermal sulfide edifices of the Juan de Fuca Ridge, northeast Pacific. *Marine ecology Progress Series* **190**: 89-112.
- Sassen, R., Joye, S., Sweet, S., DeFreitas, D., Milkov, A., and MacDonald, I.** (1999) Thermogenic gas hydrates and hydrocarbon gases in complex chemosynthetic communities, Gulf of Mexico continental slope. *Organic Geochemistry* **30**: 485-497.
- Sassen, R., Roberts, H., Carney, R., Milkov, A., DeFreitas, D., Lanoil, B., and Zhang, C.** (2004) Free hydrocarbon gas, gas hydrate, and authigenic minerals in chemosynthetic communities of the northern Gulf of Mexico continental slope: relation to microbial processes. *Chemical Geology* **205**: 195-217.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J.** (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1501-1506.
- Schrenk, M., Holden, J., and Baross, J.** (2008) Magma-to-microbe networks in the context of sulfide hosted microbial ecosystems. *Magma to microbe: modeling hydrothermal processes at oceanic spreading ridges Geophysical Monograph* **178**: 233-258.
- Schrenk, M., Kelley, D., Delaney, J., and Baross, J.** (2003) Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3580.
- Schrenk, M., Kelley, D., Bolton, S., and Baross, J.** (2004) Low archaeal diversity linked to seafloor geochemical processes at the Lost City Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* **6**: 1086-1095.
- Scott, K., Schwedock, J., Schrag, D., and Cavanaugh, C.** (2004) Influence of form IA RubisCO and environmental dissolved inorganic carbon on the $\delta^{13}C$ of the clam-chemoautotroph

symbiosis *Solemya velum*. *Environmental Microbiology* **6**: 1210-1219.

Scott, K., Henn-Sax, M., Harmer, T., Longo, D., Frame, C., and Cavanaugh, C. (2007) Kinetic isotope effect and bio-chemical characterization of form IA RubisCO from the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* MIT9313. *Limnology and Oceanography* **52**: 2199.

Seckbach, J., and Oren, A. (2009) Microbial mats: modern and ancient microorganisms in stratified systems (hardback)(series: cellular origin, life in extreme habitats and.

Shigematsu, T., Hanada, S., Eguchi, M., Kamagata, Y., Kanagawa, T., and Kurane, R. (1999) Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading *Methylomonas* sp. strains and detection of methanotrophs during in situ bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5198.

Sibuet, M., and Olu, K. (1998) Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep-Sea Research Part II* **45**: 517-567.

Sibuet, M., Olu-Le Roy, K., Wefer, G., Billel, D., Hebbeln, D., Jorgensen, B. et al. (2002) Ocean margin systems. In: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Simek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M., Hornák, K., Dolan, J., Nedoma, J. et al. (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2723.

Simon, K., Benfield, E., and Macko, S. (2008) Food web structure and the role of epilithic biofilms in cave streams. *Ecology* **84**(9): 2395-2406.

Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., Dirk van Elsas, J., and Wernars, K. (1999) Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2614.

Smith, C., and Baco, A. (2003) Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanography and Marine Biology, an Annual Review, Volume 41: An Annual Review* **41**: 311-354.

Sorokin, D. (1991) Oxidation of reduced sulfur compounds in volcanically active regions of the Plenty Bay (New Zealand) and Matupi Harbour (New Britain, Papua New Guinea). *Izv Akad Nauk SSSR Ser Biol*: 376–387.

Southward, A.J., Kennicutt, M.C., Alcalaherrera, J., Abbiati, M., Airoidi, L., Cinelli, F. et al. (1996) On the biology of submarine caves with sulphur springs: Appraisal of C-13/C-12 ratios as a guide to trophic relations. *Journal of Marine Biology U K* **76**: 265-285.

Stahl, D., and Amann, R. (1991) Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* **8**: 207–248.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D., and Costerton, J. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **56**: 187.

Suci, P., Mittelman, M., Yu, F., and Geesey, G. (1994) Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 2125.

Suess, E. (1980) Particulate organic carbon flux in the oceans—surface productivity and oxygen utilization. *Nature* **288**, 260 - 263

Suzuki, M., Taylor, L., and DeLong, E. (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4605.

Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004) Microbial Diversity in Inactive Chimney Structures from Deep-Sea Hydrothermal Systems. *Microbial Ecology* **47**: 186-196.

T

Tabita, F., Satagopan, S., Hanson, T., Kreel, N., and Scott, S. (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *Journal of Experimental Botany* **59** (7): 1515-1524

- Takai, K., and Horikoshi, K.** (1999) Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**: 1285-1297.
- Takai, K., and Horikoshi, K.** (2000) *Thermosiphon japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* **4**: 9-17.
- Takai, K., Inoue, A., and Horikoshi, K.** (2002) *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1089.
- Takai, K., Nealson, K., and Horikoshi, K.** (2004a) *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1095.
- Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F., and Orikoshi, K.** (2001) Distribution of *Archaea* in a black smoker chimney structure. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3618-3629.
- Takai, K., Nakagawa, S., Sako, Y., and Horikoshi, K.** (2003) *Balnearium lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, strictly anaerobic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a black smoker chimney in the Suiyo Seamount hydrothermal system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1947.
- Takai, K., Hirayama, H., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Nealson, K.H., and Horikoshi, K.** (2004b) *Thiomicrospira thermophila* sp. nov., a novel microaerobic, thermotolerant, sulfur-oxidizing chemolithomixotroph isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the TOTO caldera, Mariana Arc, Western Pacific. In: Soc General Microbiology **54** 2325-2333.
- Takai, K., Campbell, B.J., Cary, S.C., Suzuki, M., Oida, H., Nunoura, T. et al.** (2005) Enzymatic and Genetic Characterization of Carbon and Energy Metabolisms by Deep-Sea Hydrothermal Chemolithoautotrophic Isolates of Epsilonproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7310-7320.
- Tarasov, V., Propp, M., Propp, L., Zhirmunsky, A., Namsakav, B., Gorlenko, V., and Starynin, D.** (1990) Shallow-water gasohydrothermal vents of Ushishir Volcano and the ecosystem of Kraternaya Bight (The Kurile Islands). *Marine Ecology* **11**: 1-23.
- Taylor, C.D., and Wirsén, C.O.** (1997) Microbiology and Ecology of Filamentous Sulfur Formation. *Science* **277**: 1483-1485.
- Taylor, C.D., Wirsén, C.O., and Gaill, F.** (1999) Rapid Microbial Production of Filamentous Sulfur Mats at Hydrothermal Vents. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2253-2255.
- Teske, A., and Nelson, D.C.** (2006) The Genera *Beggiatoa* and *Thioploca*. *Prokaryotes* **6**: 784-810.
- Teske, A., and Sorensen, K.B.** (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME Journal* **2**: 3-18.
- Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V.P., and Jannasch, H.** (2002) Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1994-2007.
- Teske, A., Brinkhoff, T., Muyzer, G., Moser, D.P., Rethmeier, J., and Jannasch, H.W.** (2000) Diversity of thiosulfate-oxidizing bacteria from marine sediments and hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3125-3133.
- Tunnicliffe, V., Juniper, S., and Sibuet, M.** (2003) Reducing environments of the deep-sea floor. *Ecosystems of the Deep Oceans*: 81-110.

V

-
- Van Dover, C.** (2000) *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*: Princeton Univ Pr.
- Van Dover, C., Ward, M., Scott, J., Underdown, J., Anderson, B., Gustafson, C. et al.** (2007) A fungal epizootic in mussels at a deep sea hydrothermal vent. *Marine Ecology* **28**: 54-62.
- Van Dover, C.L., Jenkins, C.D., and Turnipseed, M.** (2001) Corralling of larvae in the deep sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **81**: 823-826.

Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E., and Lovley, D. (1998) Microbiological evidence for Fe (III) reduction on early Earth. *Nature* **395**: 65-67.

Vetriani, C., Speck, M., Ellor, S., Lutz, R., and Starovoytov, V. (2004) *Thermovibrio ammonificans* sp. nov., a thermophilic, chemolithotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 175.

Vlasceanu, L., Sarbu, S., Engel, A., and Kinkle, B. (2000) Acidic cave-wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiology Journal* **17**: 125-139.

W

Waits, J., and Leberg, P. (2000) Biases associated with population estimation using molecular tagging. *Animal Conservation* **3**: 191-199.

Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2003) Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods* **55**: 155-164.

Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M., Godfroy, A., and Barbier, G. (2001) *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 495.

Whittenbury, R., Phillips, K.C., and Wilkinson, J.F. (1970) Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of Gen Microbiology* **61**: 205-218.

Winogradsky, S. (1887) Über Schwefelbakterien. *Botanische Zeitung* **45**: 489-507.

Wintzingerode, F., Göbel, U., and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based

rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 213-229.

Wirsen, C.O., Sievert, S.M., Cavanaugh, C.M., Molyneaux, S.J., Ahmad, A., Taylor, L.T. et al. (2002) Characterization of an Autotrophic Sulfide-Oxidizing Marine *Arcobacter* sp. That Produces Filamentous Sulfur *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 316-325.

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

Y

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., and Hwang, S. (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* **89**: 670-679.

Z

Zbinden, M., Shillito, B., Le Bris, N., de Villardi de Montlaur, C., Roussel, E., Guyot, F. et al. (2008) New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **359**: 131-140.

Zobell, C. (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* **46**: 39.

Zuccaro, A., Schoch, C., Spatafora, J., Kohlmeyer, J., Draeger, S., and Mitchell, J. (2007) Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus seratus*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(4):931-41

6. Annexes

6.1. Annexe 1 : protocole d'hybridation fluorescente *in situ*

Mis au point par Sébastien Duperron, rédigé par Lucile Durand

Conditionnement des échantillons : Les échantillons bruts doivent être fixés le plus rapidement possible dans un mélange eau de mer – formaldéhyde 3% pour 2h puis conservés dans le tampon de fixation pour le FISH : soit 100% éthanol, soit 50% éthanol. Pour avoir une meilleure qualité, le mieux est 50% éthanol, 50% eau de mer ou PBS 2X.

Préparation de la résine d'inclusion : 90% polyéthylène glycol (*Sigma*, ref 305413, 121€ les 1kg en février 2007), 10% hexadecanol-1 (*Sigma*, ref 258741, 28,20€ les 100g en février 2007). La résine d'inclusion doit être **exempte de toute grosse poussière**. Elle est soluble dans l'alcool.

Peser 9 volumes de PEG dans un récipient **PROPRE** stérile à bouchon résistant à au moins 60°C. Remarque : si la résine est trop dure, il est possible de la faire chauffer pour la ramollir, son point de fusion étant proche de 37°C.

Peser 1 volume d'hexadecanol-1 et l'ajouter au PEG.

Incuber le récipient à 60°C pour au moins 3h, bouchon dévissé.

Aliquoter le mélange en tubes Falcon 50mL ou le conserver à 37°C s'il est destiné à être utilisé rapidement.

Inclusion des échantillons :

Préchauffer la résine d'inclusion à 37°C. ATTENTION, s'y prendre à l'avance si elle est prise en masse.

Préparer les différents bains dans des petits béchers **PROPRES** stériles de 3 à 5mL (ou des Eppendorfs) et les préchauffer à 37°C:

Ethanol - Eau MilliQ 80 : 20	}	Déshydratation
Ethanol absolu		
Ethanol absolu	}	Imprégnation
Résine - éthanol ½ : ½		
Résine - éthanol 2/3 : 1/3		
Résine 100%		
Résine 100%		

Déposer délicatement l'échantillon dans les bains successifs de 45min (à 1h). Donc compter environ 6h par échantillon.

Couler un bloc de résine et y installer l'échantillon de façon à ce qu'il soit dans le bon plan de coupe, au fond du bloc. Le bloc de résine d'inclusion doit être suffisamment épais pour pouvoir être raboté sans toucher à l'échantillon et tout en conservant une épaisseur permettant la coupe de ce dernier (dimensions du moule : carré d'environ 2,5cm de côté).

Réaliser un croquis du bloc d'inclusion.

Laisser refroidir le bloc jusqu'à ce qu'il prenne en masse.

Démouler le bloc bien durci et le mettre à -20°C pendant plusieurs heures avant de couper.

Coupe de l'échantillon :

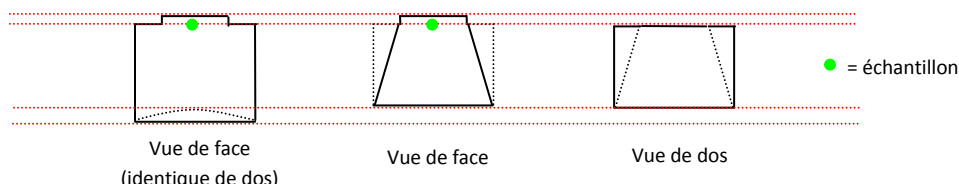
Sortir le bloc du congélateur et le maintenir sur glace.

Prédécouper le bloc au scalpel :

Enlever une petite tranche de résine du côté opposé à l'échantillon (côté où le couteau passe en premier pour couper le bloc) de sorte qu'il soit le plus plat et le plus lisse possible. Si le bloc n'est pas plat, les coupes seront très difficilement récupérables et le bloc risque de s'effriter.

Biseauter le bloc de chaque côté de l'échantillon en réalisant des incisions bien lisses et droites sur toute la hauteur des côtés du bloc.

Couper la petite excroissance sur le dessus du bloc (due à la forme du moule) au niveau de l'emplacement de l'étau de serrage.



ATTENTION, dès que l'on touche au microtome, le **frein** doit être systématiquement enclenché et le **couteau** doit être manipulé avec d'extrêmes **précautions**. Cet avertissement est à respecter d'autant plus à compter de l'étape 9.

Positionner le bloc dans l'étau de sorte que la face à couper soit bien parallèle au couteau. Serrer l'étau (suffisamment pour que le bloc tienne mais pas trop au risque de voir le bloc éclater). L'étau est alors reculé au maximum.

Insérer le couteau et le maintenir bien droit avec les vis de serrage. Le couteau doit être très propre (nettoyé à l'alcool) pour que les coupes n'accrochent pas.

Ajuster la position du couteau afin qu'il soit juste à la limite de contact avec la résine.

Ajuster l'épaisseur de coupe (pas plus de 15 µm pour les premières).

Trancher le bloc de résine jusqu'à ce que l'échantillon affleure.

Ajuster l'épaisseur de coupe (entre 11 et 4 µm).

Trancher le bloc de résine. Les coupes successives forment ainsi sur le couteau un ruban dont la taille dépend du nombre de coupes.

Récupérer une partie du ruban et la déposer sur une lame humidifiée (lames adhésives Superfrost Plus, Fischer-Bioblock, ref A5069M, environ 23€ les 72 en février 2007). Les coupes s'étaleront d'elles-mêmes. Quand leur position est satisfaisante, éliminer l'eau sur du papier absorbant en tapotant la lame verticalement sur sa tranche.

Remarques : toujours laisser au moins une coupe sur le couteau lorsque l'on récupère le ruban. La formation d'un nouveau ruban en sera favorisée.

Si les coupes ne forment pas de ruban :

Le couteau est sale, le nettoyer avec de l'alcool.

Le plan d'attaque de la coupe n'est pas plan, tailler de nouveau cette face du bloc.

Le biseau ne descend pas assez bas ou n'est pas plan, tailler de nouveau les côtés du bloc.

Le bloc est trop chaud (ou trop froid) (ou trop tiède !).

Conserver les lames à -20°C une fois sèches en attendant leur utilisation.

Hybridation in situ :

ATTENTION, à chaque manipulation des sondes ou des lames hybridées, se placer à l'obscurité afin de minimiser les effets de fading.

Passer les lames dans 3 bains successifs de 5min dans de l'éthanol à 95°. Les changements de bains permettront à la résine d'être parfaitement éliminée. Déposer les lames doucement pour ne pas décoller les coupes du support à cause de l'élimination des bulles. Changer les bains régulièrement.

Réhydrater l'échantillon 5min dans de l'éthanol 70%. Laisser la lame sécher.

Délimiter la position des coupes sur la lame par des cercles de silicone non chevauchants à l'aide d'un Pap pen (*Kisker*, ref MKP-1, 43€ en février 2007). Leur contour doit être bien scellé pour accueillir le mix sans risque de fuite entre échantillons. Un cercle peut contenir plusieurs coupes rapprochées.

Déposer 30µL de mix dans chaque cercle (2µL de chaque sonde à 8µM qsp 30µL avec le tampon d'hybridation). Chaque coupe doit être bien recouverte. ATTENTION à ne pas toucher les coupes. Eviter les bulles car la tension superficielle ainsi créée peut retenir les sondes.

Déposer la lame dans la chambre d'hybridation préchauffée à 46°C (tube Falcon 50mL contenant du papier absorbant tassé doucement jusqu'à 10-15mL et humidifié avec 5mL d'eau MilliQ stérile). ATTENTION : manipuler avec précaution pour ne pas renverser le mix entre échantillons. Attention de ne pas faire tourner la lame lors de la fermeture du tube.

Incuber le tout pendant 3h à 46°C pour permettre aux sondes de s'hybrider. Cette température est valable pour une hybridation sur de l'ARNr 16S.

Préchauffer des tubes Falcon de 50mL tampon de rinçage (1 pour le pré-rinçage global + 1 par lame) et 1 tube d'eau MilliQ stérile au bain-marie à 48°C.

Rincer les lames dans le tube Falcon de pré-rinçage (1 trempage bref mais avec un geste franc) et les placer chacune dans un tube Falcon contenant le tampon de rinçage à 48°C, à l'obscurité, pendant 15min. ATTENTION : manipuler avec précaution à la sortie du four pour ne pas renverser le mix entre échantillons. Attention de ne pas faire tourner la lame lors de l'ouverture du tube.

Rincer rapidement les lames à l'eau MilliQ stérile pré-chauffée (tube Falcon, 1 trempage bref) et laisser sécher à l'obscurité, protégé de la poussière.

Monter la préparation : 3 gouttes de milieu de montage, lamelle (24x50mm), luter la préparation.

NaCl 5M	NaCl	292,2g
	Eau MilliQ	qsp 1L

Autoclaver.

SDS 10%	SDS (qualité électrophorèse)	100g
	Eau MilliQ	qsp 1L

Chauffer à 68°C pour dissoudre sous hotte ou avec un masque.

Pas de stérilisation.

Tris-HCl 1M	Tris	121,1g
	HCl concentré	70mL pour pH 7,4
		60mL pour pH 7,6
		42mL pour pH 8
Eau MilliQ	qsp 1L	

L'acide s'ajoute au Tris dilué dans un volume d'eau de 800mL max.

Laisser reposer après ajout de l'acide.

Ajuster au pH final attendu.

Autoclaver.

Milieux de montage possibles :

Prolong gold (*Invitrogen*), nécessite une polymérisation avant observation.

SlowFade® Gold antifade reagent with DAPI (*Invitrogen*, ref. S36939, special packaging 5x2mL 155€), simple d'utilisation.

Moviol, favoriserait l'autofluorescence des tissus dans le rouge.

Vectashield, favoriserait l'autofluorescence des tissus dans le vert.

Cytiluor ?

Fluorochromes :

	Couleur visible (dilué)	Filtre	λ d'excitation (nm)	λ d'émission (nm)
Cy3 Indocarbocyanine (Eurogentec)	Rose	Cy3 HYQ	530-560 (Vert)	570-650 (Rouge)
Cy5 Indocarbocyanine (Eurogentec)	Bleu	Cy5 HYQ	590-650 (Rouge)	660-740 (Rouge-IR)
ATTO488 ATTO488 (Eurogentec)	Jaune-orange	FITC	480-515 (Bleu)	550 (Vert)

6.2. Annexe 2 : composition des milieux de culture

6.2.1. Milieu MJ 4

MJ synthetic seawater (1L)

Eau MQ qsp 1L

NaCl : 30 g

CaCl₂.2H₂O : 0.8 g

NH₄Cl : 0.25 g

NaNO₃ : 0.25 g

KCl : 0.33 g

Na₂S₂O₃ : 0.316 g

HEPES : 4.77 g (ne pas ajouter pour les cultures en fermenteur)

Ajuster le pH à 7 avec du NaOH et autoclaver

Ajouter :

10mL de solution trace

1mL solution de vitamines selon Balch

10mL (20 mg) d'une solution de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O à 2 mg/mL (filtrée et non autoclavée)

1mL (0.5mg et 0.1mg) d'une solution de Na₂SeO₃.5H₂O (à 50mg/100mL ; MM= 172,9) et de Na₂WO₄•2H₂O (à 10mg/100mL ; MM=293.8)

5mL (0.14g) d'une solution de K₂HPO₄ à 2.8g/100mL

10mL (3.4g) d'une solution de MgSO₄.7H₂O (MM=246,48) à 34g/100mL

10mL (4,18g) d'une solution de MgCl₂.6H₂O (MM= 95,2) à 41.8 g /100 mL

1mL (0,5mg) d'une solution de NiCl₂.6H₂O (MM= 129,6) à 50 mg / 100 mL

Pour fermenteur :

1ml d'une solution d'acétate (C₂H₃NaO₂; MM= 82) à 1% (1 g / 100 mL)

Pour culture en gradient :

5mL d'une solution (0,5g/L soit 6mM) d'une solution de NaHCO₃ (MM=84) à 0,1g/mL

0,6mL d'une solution de phenol red stérile à 0,5% par litre

Ces solutions sont autoclavées séparément sauf les vitamines et la solution de solution de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O qui sont filtrées (ajuster le pH des solutions à 7 avant de les ajouter).

Solution trace pour MJ synthetic seawater

Eau MQ	qsp 1L
acide nitrilotriacétique :	1,5 g
MgSO ₄ .6H ₂ O :	3 g
MnSO ₄ .2H ₂ O :	0,5 g
NaCl :	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O :	0,1 g
CoSO ₄ .7H ₂ O :	0,18 g
CaCl ₂ .2H ₂ O :	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O :	0,18 g
CuSO ₄ .5H ₂ O :	0,01 g
KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O :	0,02 g
H ₃ BO ₃ :	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O :	0,01 g
NiCl ₂ .6H ₂ O :	0,025 g
NaSeO ₃ .5H ₂ O :	0,3 mg

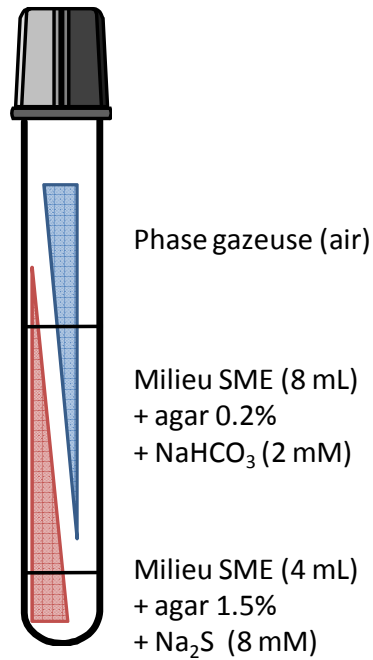
Ajuster le pH à 7.5 avec du NaOH.

Solution de vitamines (Balch et al., 1979)

Eau MQ	qsp 1L
biotine :	2 mg
acide folique :	2 mg
pyridoxine hydrochloride :	10 mg
thiamine hydrochloride :	5 mg
riboflavine :	5 mg
acide nicotinique :	5 mg
DL-calcium pantothenate :	5 mg
vitamine B12 :	0,1 mg
acide p-aminobenzoic :	5 mg
acide lipoïque :	5 mg

6.2.2. Milieu gélosé pour *Beggiatoa* avec une base SME

Des milieux semi-solides (0,2% agar), permettant de créer des gradients de sulfures et d'oxygène (cf. 1.5.6.) ont été réalisés en tubes Hungate de 20 mL suivant la méthode présentée ci-après :



MILIEU SME modifié en fiole pour autotrophe (Raven et al., 1992a; Godfroy et al., 2006a)

NaCl	28 g/L
PIPES	6,05 g/L
Magnesium Salt Sol.	10 ml/L
Solution A	1 ml/L
Solution B	1 ml/L
Solution C	1 ml/L
Solution D	1 ml/L
Résazurine	5 gouttes/l
soufre	10 g/L
eau distillée	qsp 1 L

Ajuster le pH à 7

Tyndaliser le milieu 2 fois 30 min à 100°C après un refroidissement complet d'une nuit entre les 2 tyndalisations.

Ajouter 0,5 ml/L de vitamines pour SME

Magnesium Salt Stock Solution

MgSO ₄ ,7 H ₂ O	180 g
MgCl ₂ ,6 H ₂ O	140 g
eau distillée	qsp 1 L

Solution A

MnSO ₄ , 4 H ₂ O	9 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	2,5 g
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	2,5 g
AlK(SO ₄) ₂ , 12 H ₂ O	0,3 g
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,3 g
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,15 g
Trisodium citrate	4 g
eau distillée	qsp 1 L

Solution B

CaCl ₂ , 2 H ₂ O	56 g
NaBr	25 g
KCl	16 g
KI	10 g
SrCl ₂ , 6 H ₂ O	4 g
eau distillée	qsp 1 L

Solution C

K ₂ HPO ₄	50 g
H ₃ BO ₃	7,5 g
Na ₂ WO ₄ , 2 H ₂ O	3,3 g
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,15 g
Na ₂ SeO ₃	0,005 g
eau distillée	qsp 1 L

Solution D

FeCl ₂ , 4 H ₂ O	10 g
Hydrochloric acid 1M	qsp 1L

Vitamine solution pour SME

Biotine	40 mg
Acide folique	40 mg
Pyridoxine-HCl	200 mg
Thiamine HCl	100 mg
Riboflavine	100 mg
Acide nicotinique	100 mg
DL. Calcium pantothenate	100 mg
Vitamine B12	2 mg
Acide lipoïque	100 mg
éthanol dans eau distillée 50 % V/V	qsp 1 L

Solution de résazurine

résazurine 1 g
eau distillée qsp 1L

6.2.3. Fluide hydrothermal dilué et méthane

De l'eau a été prélevée sur le site de Tour Eiffel avec le PEP (prélèvement d'eau par pompage) du Victor 6000 dans des poches de 5L stériles. L'eau a ensuite été filtrée à 0,2 µm puis distribuée dans des fioles pénicilline de 50 ml (10 ml de milieu par fiole). Du méthane a été ajouté à la phase gazeuse de ces fioles jusqu'à atteindre une pression de 2 bars.

6.3. Annexe 3: Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents

The ISME Journal (2009) 3, 117–123

© 2009 International Society for Microbial Ecology. All rights reserved 1751-7362/09 \$32.00

www.nature.com/ismej



ORIGINAL ARTICLE

Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents

Nathalie Byrne¹, Marc Strous², Valentin Crépeau¹, Boran Kartal², Jean-Louis Birrien¹, Markus Schmid², Françoise Lesongeur¹, Stefan Schouten³, Andrea Jaeschke³, Mike Jetten², Daniel Prieur¹ and Anne Godfroy¹

¹Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR6197 IFREMER, Centre de Brest–BP70/IUEM, Plouzane, France; ²Department of Microbiology, Institute for Water and Wetland Research, Radboud University Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands and ³Department of Marine Organic Biogeochemistry, NIOZ Royal Netherlands Institute for Sea Research, Den Burg, The Netherlands

Recent studies indicate that ammonia is an important electron donor for the oxidation of fixed nitrogen, both in the marine water column and sediments. This process, known as anammox, has so far only been observed in a large range of temperature habitats. The present study investigated the role of anammox in hydrothermal settings. During three oceanographic expeditions to the Mid-Atlantic Ridge, hydrothermal samples were collected from five vent sites, at depths ranging from 750 to 3650 m from cold to hot habitats. Evidence for the occurrence of anammox in these particular habitats was demonstrated by concurrent surveys, including the amplification of 16S rRNA gene sequences related to known anammox bacteria, ladderane lipids analysis and measurement of a ¹⁴N¹⁵N dinitrogen production in isotope-pairing experiments at 60 and 85 °C. Together these results indicate that new deep-branching anammox bacteria may be active in these hot habitats.

The ISME Journal (2009) 3, 117–123; doi:10.1038/ismej.2008.72; published online 31 July 2008

Subject Category: microbial ecology and functional diversity of natural habitats

Keywords: anammox; micro-organisms; activity; 16S rRNA; ladderanes; hydrothermal vent

Introduction

Research on anammox—the anaerobic oxidation of ammonium—has a long history. Since 1932, anomalous nitrogen losses were noticed in water sediments (Allgeier *et al.*, 1932) and anoxic fjords (Richards, 1965). In the last decade, anammox bacteria have been actively investigated, leading to a basic understanding of the metabolism and biodiversity of these unique prokaryotes (Strous *et al.*, 1999a).

In oceanic ecosystems and anoxic basins and fjords, denitrification (the microbial conversion of nitrate to N₂) was previously considered as the main process converting fixed nitrogen to gaseous N₂. It was recently discovered that the anaerobic oxidation of ammonium coupled to nitrite reduction could be responsible for a significant fraction of N₂ production in marine sediments (Thamdrup and Dalsgaard,

2002). Nutrient profiles, activity measurements, ladderane lipids analysis, 16S rRNA gene sequences and fluorescent *in situ* hybridization showed that *Candidatus ‘Scalindua sorokinii’* was present and active in the anoxic basin of the Black Sea (Kuypers *et al.*, 2003). In the meantime, many studies have shown that the anammox bacteria and the anammox process are ubiquitous and constitute a substantial sink of fixed nitrogen in the oceans (Dalsgaard *et al.*, 2003; Kuypers *et al.*, 2003; Penton *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2007). The process is also significant in minimum oxygen zones (Kuypers *et al.*, 2005; Hamersley *et al.*, 2007; Jaeschke *et al.*, 2007), sediments (Engstrom *et al.*, 2005; Penton *et al.*, 2006) and estuaries (Trimmer *et al.*, 2003; Tal *et al.*, 2005). These are all mesophilic to cold environments, and it is presently unknown whether anammox bacteria are also active at higher temperatures in marine ecosystems.

Hot environments are significant in past and present oceans, and deep-sea hydrothermal vents are well known examples of such environments. Deep-sea hydrothermal vents are small, patchy, unstable habitats, characterized by steep chemical and physical gradients because of the mixing of the super heated hydrothermal anoxic fluid with cold

Correspondence: N Byrne, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR6197 IFREMER, Centre de Brest, BP70, 29280 Plouzane, France.

E-mail: nathalie.byrne@univ-brest.fr

Received 29 April 2008; revised 27 June 2008; accepted 1 July 2008; published online 31 July 2008

oxic seawater. Biological communities are distributed along these gradients where the decrease in temperature is more or less correlated with the transition from anoxic to oxic conditions. Reduced compounds are available along the gradient and can be used as energy sources by the prokaryotes.

Since the discovery of hydrothermal vents in 1977, microbiological studies were primarily devoted to the high temperature part of this ecosystem and resulted in the isolation of numerous prokaryotes (Miroshnichenko, 2004). New species belonging to both the Archaea and Bacteria were isolated and described. In addition, molecular approaches have revealed astonishing microbial diversity, which includes numerous as-yet-uncultivated organisms that likely reflect the unusual environmental setting of the deep-sea hydrothermal vent (Takai *et al.*, 2001; Alain *et al.*, 2002b; Nercessian *et al.*, 2003; Schrenk *et al.*, 2003).

In the nitrogen cycle, oxidation of ammonium has been demonstrated by the isolation of thermophilic heterotrophic nitrifiers growing aerobically at 65 °C (Mével and Prieur, 1998). Thermophilic nitrate-reducers (denitrifiers) belonging to the archaeal and bacterial domains have also been isolated and described (Alain *et al.*, 2002a). A methanoarchaeon was recently found to fix nitrogen at 92 °C, and this completes the current understanding of the nitrogen cycle in high-temperature environments (Mehta and Baross, 2006). Even more recently, thermophilic autotrophic nitrifiers were enriched from terrestrial hot springs (de la Torre *et al.*, 2008). On the other hand, numerous unsuccessful attempts have been

made to enrich or isolate autotrophic nitrifiers from hot environments. The present study is the first to address the presence and activity of anammox microorganisms at high temperatures. So far, the highest temperature at which anammox activity has been observed was 43 °C, namely for a laboratory culture enrichment of *Candidatus Brocadia anammoxidans* (Strous *et al.*, 1999b).

In this study, various samples, collected along the temperature gradient of several Mid-Atlantic Ridge vent fields, were processed through molecular, chemical and microbiological methods for detection of anammox bacteria and/or anammox activity. The result of this investigation yielded strong indication of the presence and activity of new anammox bacteria in different hydrothermal areas.

Materials and methods

Samples

Hydrothermal samples were retrieved from five hydrothermal sites: Rainbow (36.2°N, 33.9°W), Lucky Strike (37.29°N, 32.28°W), Lost City (30.07°N, 42.07°W), TAG (26°08'N, 44°49'W) and Menez Gwen (37.85°N; 31.51°W) on the Mid-Atlantic Ridge (Table 1), during the scientific cruises EXOMAR in 2005, MoMARETO in 2006 and MoMARDREAM in 2007 on the 'R/V Atalante' and 'R/V Pourquoi Pas?' using the remote-operated vehicle Victor 6000 and the submersible Nautilie. Samples were obtained in such a way that the different biotopes of the ecosystem along the

Table 1 Main characteristics of the hydrothermal samples: sampling sites, temperature, sample types, molecular biology results and rates of anammox

	Samples	Temperature (°C)	Lipids analysis— ladderanes PC-mono ether (V) pg/g 'sediment'	Molecular biology	Anammox activity (nmol ml ⁻¹ sample per day = μM day ⁻¹)
Mat 1	Lucky Strike (depth: 1700 m)	4–8	ND	Cluster A	ND
MO22	Microbial mat on <i>Bathymodiolus azoricus</i>				
Mat 2	Lucky Strike (depth: 1700 m)	4–8	ND	Clusters A and B	ND
MO23	Microbial mats				
Mussels 2	Menez Gwen (depth: 850 m)	4–10	ND	Cluster A	ND
MO16 E2	<i>Bathymodiolus azoricus</i>				
Shrimp 1	Rainbow (depth: 2300 m)	4–10	ND	Data not shown	ND
EXO6 E1	<i>Rimicaris exoculata</i>				
Chimney 1	Lucky Strike (depth: 1700 m)	30	ND	Cluster A	ND
EXO5 E1	Active chimney (iron silica)				
Chimney 4	Lost City (depth: 750 m)	91	20	Cluster B	0.03
EXO17 E1	Carbonate active chimney (pH 10)				
Chimney 3	Lost City (depth: 750 m)	93	ND	Cluster A	ND
EXO16 E1	Carbonate active chimney (pH 10)				
Chimney 6	TAG (depth: 3650 m)	> 100	91	Planctomycetes	0.02
EXO13 E1	Active chimney				
Chimney 7	TAG (depth: 3650 m)	> 100	40	Planctomycetes	0.01
EXO14	Active chimney				
Chimney 8	Rainbow (depth: 2300 m)	> 100	ND	Clusters A and B	0
MO8 E1	Active chimney				
Chimney 10	Rainbow (depth: 2300 m)	153	35	Cluster B	0.03
MOM07	Active chimney				

temperature gradient were covered as good as possible. To this end, active smoker, animals and microbial mats were sampled. Active hydrothermal chimney fragments, where fluid temperature ranged from 30 to 300 °C, were collected by the tele-operated arm of the remote-operated vehicle or Nautilie. Samples were transferred to the surface in a previously decontaminated insulated box. Mussels and shrimps were collected in insulated boxes and using a slurp gun device, respectively. Microbial mats were sampled using the PEPITO water sampler (Sarrazin and Sarradin, 2006), and concentrated on 0.22 µm pore-size polycarbonate filters while on board. Chimney and animal samples (mussels' gills and whole shrimps) were crushed in sterile seawater. One aliquot was immediately transferred to a flask or bottle, flushed with 100% helium and stored at 4 °C, for further anammox activity measurements. A second aliquot was frozen at -80 °C for DNA extraction. Microbial mat samples were stored at -80 °C for DNA extraction.

Molecular techniques and phylogenetic analysis

DNA isolation and polymerase chain reaction were carried out as described by Schmid *et al.* (2005), except for DNA extraction from the chimney sample, which was performed using the Fast DNA kit for soil samples (Webster *et al.*, 2003). Samples were extracted several times, pooled and concentrated. 16S rRNA partial genes were amplified using the specific anammox primers Pla46F (5'-GGATTAGG CATGCAAGTC-3'), BS820R (5'-TAATTCCTCTATTA GT-3') and Amx820R (5'-AAACCCCTCTACTTAGTG CCC-3') (Jetten *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2005). Polymerase chain reaction products were subsequently cloned with the TOPO XL cloning kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manual provided by the manufacturer and sequenced at OUEST-Genopole (Roscoff, France). The molecular work was carried out in the laboratory in Brest where no culture of anammox planctomycetes was ever present.

BLAST homology searches were carried out to determine phylogenetic affiliations. Sequences were aligned using the BioEdit software version 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), and ClustalW. Trees were constructed using the PHYLO_WIN program on the basis of evolutionary distance and maximum likelihood methods (Galtier *et al.*, 1996). The robustness of the inferred topologies was tested by bootstrap resampling of trees calculated on the basis of the evolutionary distance, neighbor-joining algorithm with Jukes-Cantor correction. The overall tree topology was confirmed by further analysis with distance matrix and maximum parsimony methods.

Ladderane phosphocholine-monoalkylether analysis

Lipids were ultrasonically extracted from four chimney samples (4, 6, 7 and 10; approximately 4 g

dry weight) according to a modified method of Bligh and Dyer (1959), using three times a mixture of methanol, dichloromethane and phosphate buffer at pH 7.4 (2:1:0.8, vol/vol/vol). The extracts were combined and further dichloromethane and buffer were added to the mixture to achieve a final methanol/dichloromethane/buffer ratio of 1:1:0.9 (vol/vol/vol). The phases were separated and the extraction repeated three more times. An aliquot of the extract was dissolved in a dichloromethane/methanol mixture (9:1, vol/vol) and filtered through a 0.45 µm, 4 mm diameter RC filter.

The C₂₀-[3]-monoalkylether containing a phosphocholine (PC) headgroup (for structure see Figure 1) was analyzed by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization-MS/MS according to Boumann *et al.* (2006), with some modifications. Separation was achieved on a LiChrospher diol column (250 mm × 2.1 mm, 5 µm particles) maintained at 30 °C. The following linear gradient was used with a flow rate of 0.2 ml min⁻¹: 90% A/10% B to 70% A/30% B over 10 min, maintained for 20 min; then to 35% A/65% B in 15 min, maintained for 15 min; and then back to 100% A for 20 min to re-equilibrate the column, where A is hexane/2-propanol/formic acid/14.8 M NH_{3(aq)} in the ratio 79:20:0.12:0.04 (vol/vol/vol/vol) and B is 2-propanol/water/formic acid/14.8 M NH_{3(aq)} in the ratio 88:10:0.12:0.04 (vol/vol/vol/vol). Detection of the C₂₀-[3]-monoalkylether-PC was achieved by selec-

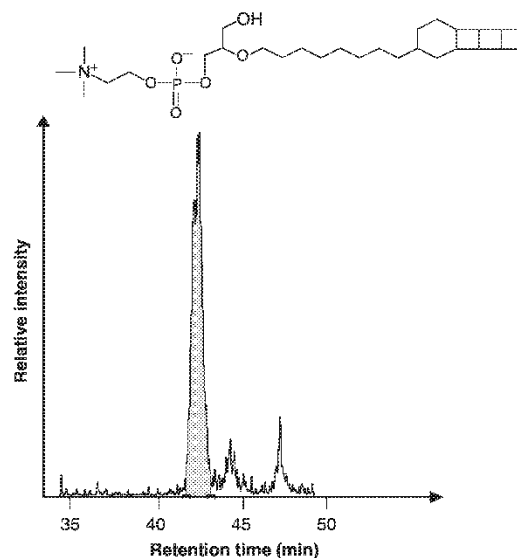


Figure 1 Selective reaction monitoring trace of the intact ladderane monoalkylether lipid with phosphocholine headgroup obtained by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the total-lipid extract of chimney 6 sample and the corresponding structure.

tive reaction monitoring of the transition from m/z 530, the $[M + H]^+$ ion, to m/z 184 (corresponding to the PC headgroup), with 1.5 mtorr argon as collision gas and 20 V collision energy. Quantification of intact ladderane ether lipids was done by an external calibration curve of an isolated C_{20} -[3]-monoalkylether-PC standard (43% purity). A detection limit of 10 pg injected into the column was achieved with this technique.

Activity measurements

Anammox activities were measured for chimney samples 4, 6, 7, 8 and 10 stored under a helium atmosphere. Each sample was incubated with a mixture of $^{14}NH_4^+$ (final concentration 20 μM) and $^{15}NO_2^-$ (final concentration 20 μM) at temperatures of 30, 60 and 85 °C. Three gas analyses were performed after 20, 44 and 68 h incubation. For each measurement, 500 μl gas was injected into a gas chromatogram coupled to an isotope ratio mass spectrometer (Thermo Finnigan delta plus). All gas samples were analyzed for their content of $^{14}N^{15}N$ dinitrogen gas, a direct evidence for anammox activity (Strous *et al.*, 1999a; Kartal *et al.*, 2007). Activity measurements were carried out at Nijmegen University (The Netherlands).

Nucleotide sequence accession numbers

The EMBL accession numbers of the sequences used in this study are AM941022–AM941038.

Results and discussion

Molecular detection of anammox bacteria in the hydrothermal vent ecosystem

Using anammox-specific primers, 16S rRNA gene sequences were retrieved from different representative samples of the vent ecosystem and from various hydrothermal sites (Figure 2). In the cold part of the ecosystem, several anammox 16S rRNA gene sequences were found in microbial mats and mussel gills (Figure 2). Some of the mussel sequences were related to known anammox bacteria. The similarity of 'mussel 2.2, 2.4' to marine *Candidatus 'Scalindua sp'* was about 93%, whereas for 'mussel 2.5 and 2.6', a similarity of 97% was observed to *Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'*. The other retrieved 16S rRNA gene sequences (mat 1.8, 2.3, 2.4, 2.10 and mussel 2.13) were related to uncultivated bacteria outside the known anammox clade.

All these sequences branched close to the root of the anammox line of descent. Sequences with highest similarity to these were previously detected in geothermal areas and in the deep sulfidic water column of the Black Sea. Presently, it is not possible to assign these 16S rRNA gene sequences to bacteria with verified anammox metabolism. In mat samples, the concentrations of ammonium (8–10 μM), nitrite (0–2 μM), as well as a pH range between 6.2 and 8

and temperature between 4 and 10 °C (Sarradin *et al.*, 1999), are compatible with the physiology of the known anammox bacteria (Strous *et al.*, 1999a; Jetten *et al.*, 2005).

At the Menez Gwen vent field, three anammox sequences were retrieved from mussel gills (mussel 2.2, 2.4, 2.5). One sequence (mussel 2.6) was distantly related to the genus *Candidatus 'Kuenenia sp'* (93% similarity), one (mussel 2.5) to *Candidatus 'Scalindua sp'* (97% similarity) and another to uncultivated Planctomycetes (mussel 2.13) from the Black Sea. Temperature, pH and chemical conditions were similar to those measured for the microbial mats from Lucky Strike (Sarradin *et al.*, 1999). Nevertheless, as oxygen is present in the mussel gills, the anammox reaction should theoretically be inhibited. But, high concentrations of sulfide measured in the inner shell water could induce temporary or local anoxic conditions (Dando P and Sarradin PM, Personal communication). Unfortunately, no activity measurements could be performed to confirm these molecular data because animal samples cannot be preserved at 4 °C without any degradation until analysis.

Hydrothermal vent active chimneys are typically hot and 'anaerobic' habitats where suitable amounts of nitrites and ammonium are present. Chimney 1 yielded sequences distantly related to Planctomycetes from the sulfidic basin of the Black Sea (up to 82% similarity) (Kuypers *et al.*, 2003) and from other hydrothermal sites. Interestingly, chimneys 8 and 10 yielded sequences in box B (Figure 2), forming a clade with sequence 'mat 2.6' and a sequence from a biofilter-treating pig manure. Finally, a sequence closely related to the genus *Candidatus 'Kuenenia sp'* (98% similarity) was obtained from chimney 8 from the Rainbow vent field where fluid temperatures of up to 300 °C were measured. Owing to high background fluorescence in the chimney samples, fluorescent *in situ* hybridization analysis with specific anammox probes could not be performed.

Ladderane PC-monoalkylether analysis

In addition to 16S rRNA gene sequences, independent specific biomarkers, the so-called ladderane lipids, were used to trace anammox bacteria in hydrothermal chimney samples (Table 1). We specifically targeted the intact ladderane monoether lipid with a PC headgroup, as phospholipids are derived from living biomass rather than dead cell material (White *et al.*, 1979). Furthermore, this lipid is present in nearly all presently known anammox genera (Ratray *et al.*, 2008). We detected this PC ladderane lipid in all four chimney samples 4, 6, 7 and 10 at a range between 20 and 91 $pg g^{-1}$ of sediment.

Activity measurements

To support the molecular and biomarker data, activity measurements were performed on chimney

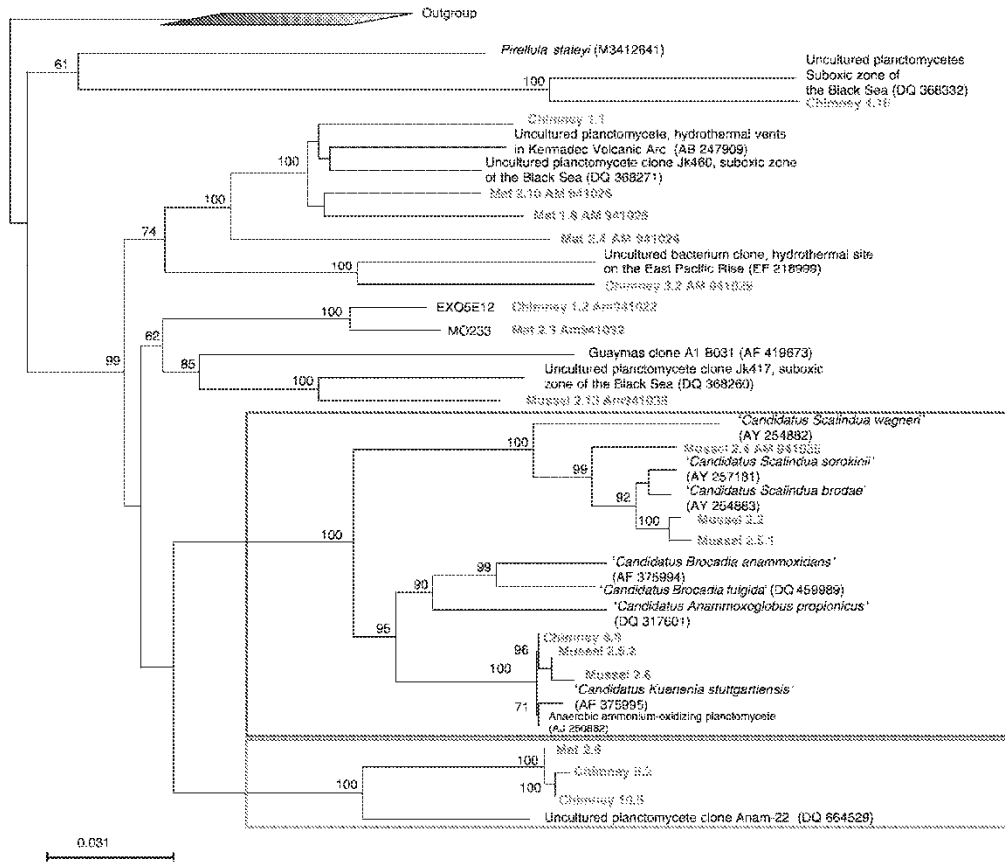


Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences determined by neighbor-joining analysis. The out group used was Gemmata sp and Isosphaera sp. The numbers at the nodes are the bootstrap values (in percentage). Bootstrap values above 50% are displayed. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position. Cluster 'A' contains all known anammox sequences; cluster B is the potential anammox cluster closest to the anammox cluster, containing DQ 664529.

Table 2 Measurements of activity rates for the hydrothermal vent samples

Chimney	Temperature (°C)	N ₂ production (nmol ml ⁻¹ sample per day)	Cell density (cells ml ⁻¹)
6	30	0.02	8.9 × 10 ³
7	60	0.01	4.79 × 10 ³
10	60	0.01	4.79 × 10 ³
4	85	0.03	1.44 × 10 ⁴
10	85	0.03	1.44 × 10 ⁴

Samples were incubated with 20 μM labeled nitrite and the production of ¹⁴ ¹⁵N₂ was measured by gas chromatogram coupled to a mass spectrometer. The results are expressed in μM per day per sample. The estimated cellular density corresponding to the measured activity has been calculated from the calibration curve traced with the control *Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'*.

samples (Table 2). *Kuenenia stuttgartiensis* cells, used as positive control, were active at 30 °C and showed no activity at 60 and 85 °C. Anammox

activity was also detected at 30 °C for the chimney 6 sample at a rate of 0.02 μM day⁻¹.

At 60 °C, anammox activity was measured in chimney 7 and 10 at a rate of 0.01 μM day⁻¹. Anammox activity could be measured at 85 °C as well in chimney 4 and 10 samples, and the rate was 0.03 μM day⁻¹ at 85 °C. These rates are in the range of anaerobic ammonium oxidation rates measured in the Black Sea (Kuypers *et al.*, 2003) and in the Benguela upwelling system (Kuypers *et al.*, 2005). The inferred number of active anammox cells that could be expected from these results was between 4.79 × 10³ and 1.44 × 10⁴ cells ml⁻¹.

In conclusion, all our results suggested that anaerobic ammonium-oxidizing bacteria are present and active in hydrothermal vent areas, possibly even at high temperatures. Ladderane lipids, 16S rRNA gene sequences and anammox activity were detected in chimney samples 4, 6, 7 and 10. In addition, for two of them, some sequences retrieved

from chimney samples 4 and 10 clustered in clade B (Figure 2), suggesting that the phylotype might represent a new anammox clade. Our future effort will focus on the enrichment of the members of this cluster in a laboratory scale bioreactor.

Anammox metabolism in marine ecosystems was an important discovery for the oceanic nitrogen cycle (Dalsgaard *et al.*, 2003; Kuypers *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2005); anammox bacteria highlighted in hydrothermal ecosystems could allow a better comprehension of the nitrogen cycle in the deep ocean.

Acknowledgements

We thank Anne Godfroy, Pierre-Marie Sarradin and José Sarrazin, and Françoise Gaill, chief scientists of the EXOMAR, MoMARETO and MoMARDREAM cruises, respectively, as well as the captain and crew of the research vessels *Atalante* and *Pourquoi pas?* and the Victor and Nautille team. We also thank Jelle Eygenstein (Radboud University Nijmegen) for his help with the isotope ratio mass spectrometer; Katharina Ertwig for solving the gas contamination problems; and all people who are working in the department of Microbiology (Radboud University Nijmegen) and in the LMEE laboratory in Brest for the hospitality and help during various part of the work. We thank Karine Alain for help with reading the paper. This work was supported by ANR DEEP OASES and Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (grant for NB).

References

- Alain K, Querellou J, Lesongeur F, Pignet P, Crassous P, Raguene G *et al.* (2002a). *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1317–1323.
- Alain K, Olagnon M, Desbruyeres D, Page A, Barbier G, Juniper SK *et al.* (2002b). Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 463–476.
- Allgeier RJ, Peterson WH, Juday C, Birge EA. (1932). The anaerobic fermentation of lake deposits. *Int Rev Hydrobiol* **26**: 444–461.
- Bligh EG, Dyer WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917.
- Boumann HA, Hopmans EC, van de Leemput I, Op den Camp HJM, van de Vossenberg J, Strous M *et al.* (2006). Ladderane phospholipids in anammox bacteria comprise phosphocholine and phosphoethanolamine headgroups. *FEMS Microbiol Lett* **258**: 297–304.
- Dalsgaard T, Canfield D, Petersen J, Thamdrup B, Acuna-Gonzalez J. (2003). N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* **422**: 606–608.
- de la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, Konneke M, Stahl DA. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol* **10**: 810–818.
- Engstrom P, Dalsgaard T, Hulth S, Aller RC. (2005). Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox): implications for N₂ production in coastal marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta* **69**: 2057–2065.
- Galtier N, Gouy M, Gautier C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**: 543–548.
- Hammersley M, Lavik G, Woebken D. (2007). Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr* **71**: 1066–1071.
- Jaeschke A, Hopmans E, Wakeham S, Schouten S, Damste J. (2007). The presence of ladderanes lipids in the oxygen minimum zone of the Arabian Sea indicates nitrogen loss through anammox. *Limnol Oceanogr* **52**: 780–786.
- Jetten MS, Schmid M, Van de Pas-Schoonen KT, Damste JSS, Strous M. (2005). Anammox organisms: enrichment, cultivation and environmental analysis. *Methods Enzymol* **397**: 34–57.
- Kartal B, Kuypers MMM, Lavik G, Schalk J, Op den Camp HJM, Jetten MSM *et al.* (2007). Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ Microbiol* **9**: 635–642.
- Kuypers MM, Lavik G, Woebken D, Schmid M, Fuchs BM, Amann R *et al.* (2005). Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6478–6483.
- Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, Schmid M, Jorgensen BB, Kuenen JG *et al.* (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* **422**: 608–611.
- Mehta M, Baross J. (2006). Nitrogen fixation at 92 °C by a hydrothermal vent archaeon. *Science* **314**: 1783–1785.
- Mével G, Prieur D. (1998). Thermophilic heterotrophic nitrifiers isolated from Mid-Atlantic Ridge deep-sea hydrothermal vents. *Can J Microbiol* **44**: 723–733.
- Meyer RL, Risgaard-Petersen N, Allen DE. (2005). Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6142–6149.
- Miroshnichenko ML. (2004). Thermophilic microbial communities of deep-sea hydrothermal vents. *Microbiology* **73**: 1–13.
- Nercessian O, Reysenbach A-L, Prieur D, Jeanthon C. (2003). Archaeal diversity associated with *in situ* samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). *Environ Microbiol* **5**: 492–502.
- Penton CR, Devol AH, Tiedje JM. (2006). Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6829–6832.
- Rattray JE, van de Vossenberg J, Hopmans EC, Kartal B, van Niftrik L, Rijpstra WIC *et al.* (2008). Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria. *Arch Microbiol* **190**: 51–66.
- Richards FA. (1965). Anoxic basins and fjords. *Chemical Oceanography*. Academic Press: London. pp 611–645.
- Sarradin P-M, Caprais J-C, Riso R, Kerouel R, Aminot A. (1999). Chemical environment of the hydrothermal mussel communities in the Lucky Strike and Menez Gwen vent fields, Mid Atlantic Ridge. *Cah Biol Mar* **40**: 93–104.

- Sarrazin J, Sarradin PM. (2006). MoMARETO: a cruise dedicated to the spatio temporal dynamic and the adaptations of hydrothermal vent fauna on the mid-Atlantic Ridge. *Int Res Interidge News* **15**: 24–33.
- Schmid MC, Risgaard-Petersen N, van de Vossenberg J, Kuypers MMM, Lavik G, Petersen J *et al.* (2007). Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ Microbiol* **9**: 1476–1484.
- Schmid MC, Maas B, Dapena A, van de Pas-Schoonen K, van de Vossenberg J, Kartal B *et al.* (2005). Biomarkers for *in situ* detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1677–1684.
- Schrenk MO, Kelley DS, Delaney JR, Baross JA. (2003). Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Appl Environ Microbiol* pp 3580–3592.
- Strous M, Kuenen JG, Jetten MS. (1999a). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3248–3250.
- Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT *et al.* (1999b). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**: 446–449.
- Takai K, Komatsu T, Inagaki F, Horikoshi K. (2001). Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3618–3629.
- Tal Y, Watts JE, Schreier HJ. (2005). Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1816–1821.
- Thamdrup B, Dalsgaard T. (2002). Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1312–1318.
- Trimmer M, Nicholls J, Deflandre B. (2003). Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6447–6454.
- Webster G, Newberry CJ, Fry JC, Weightman AJ. (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16s rDNA-based techniques: a cautionary tale. *J Microbiol Methods* **55**: 155–164.
- White DC, Davis WM, Nickels JS, King JD, Bobbie RJ. (1979). Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* **40**: 51–62.



Abstract

The Lucky Strike hydrothermal vent field is located on the Mid-Atlantic Ridge at a depth of 1650-1700 meters). Mussels (*Bathymodiolus azoricus*) dominate the megafauna and form large assemblages in low temperature flow areas. The environment around these assemblages is characterized by sulfides and methane concentrations permitting chemosynthetic activity. Lucky Strike's microbial mats appeared as white attached filaments covering a large part of the mussel assemblages and fluid exposed hydrothermal deposits. Light microscopy observations revealed a wide diversity of morphologies both in shape and size among microbial populations.

To better understand microbial mats function in the ecosystem and their possible relationships with other biological communities, their diversity and metabolically active populations were investigated through molecular and cultural approaches.

Archaeal diversity appeared to be limited to the *Thaumarchaeota* but bacterial diversity was considerably higher, even if the *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* phyla were dominant. DNA and RNA functional gene libraries analyses also revealed the diversity and activity of chemolithoautotrophic populations. Both PCR and RT-PCR, using new *Bathymodiolus* sp. symbionts 16S rRNA specific gene primers, revealed sequences affiliated to both methanotrophic and thiotrophic mussel endosymbionts, suggesting that living symbionts are present in the mats samples.

Cultural approaches didn't allow us to isolate new species, but we performed a long time enrichment culture under controlled conditions during the Bathyluck (2009) cruise. The molecular survey of this culture, designed for sulfo-oxidizers, revealed organotrophic and lithotrophic communities that were not retrieved by the molecular characterization of environmental mat samples

Keywords: microbial mats, Lucky Strike, sulfur oxidation, methanotrophy, autotrophy, *Bathymodiolus azoricus*, bioreactor culture

Résumé

Le site de Lucky Strike est situé le long de la ride médio-atlantique à une profondeur d'environ 1700 mètres. Sa faune est dominée par des modioles (*Bathymodiolus azoricus*) qui forment de larges moulières autour des structures exposées au fluide hydrothermal. Des tapis microbiens recouvrent la plupart de ces moulières ainsi que certaines zones de dépôts hydrothermaux sous l'influence du fluide. Ils sont composés de filaments blancs englobés dans une matrice qui maintient une grande diversité morphologique de procaryotes autour d'eux.

La composition et le rôle de ces tapis microbiens étaient inconnus et leurs interactions avec la faune environnante peu comprises. Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse se proposaient d'identifier – par des approches moléculaires, mais également culturelles – les micro-organismes présents et métaboliquement actifs en leur sein.

Les diversités phylogénétique et fonctionnelle des tapis échantillonnés ont ainsi été caractérisées. Une attention particulière a été portée aux populations lithotrophes (oxydation des composés soufrés ou du méthane) et autotrophes (fixation du carbone inorganique). Ces travaux ont permis de mettre en évidence une diversité archéenne restreinte aux *Thaumarchaeota* et une importante diversité bactérienne, dominée par le phylum des *Proteobacteria*. Les banques de clones ont également révélé une diversité d'organismes lithotrophes et/ou autotrophes. Des amorces spécifiques du gène de l'ARN ribosomal 16S des symbiontes de *Bathymodiolus* sp. ont également permis – par PCR et RT-PCR – d'établir des banques de clones étroitement affiliés aux symbiontes thiotrophes et méthanotrophes de *Bathymodiolus azoricus*.

Pour le volet culturel, différentes cultures d'enrichissement ciblant les organismes lithoautotrophes ont été réalisées au cours des campagnes MoMAR-08 (2008) et Bathyluck (2009). Ces travaux n'ont pas abouti à l'isolement de nouvelles souches, mais la campagne Bathyluck nous a permis de réaliser une culture d'enrichissement en fermenteur ciblant les populations sulfo-oxydantes. Le suivi moléculaire de cette culture, sur une période de 85 jours, a révélé des communautés organotrophes et lithotrophes non détectées lors des approches moléculaires sur échantillons environnementaux.

Mots-clés : tapis microbiens, Lucky Strike, sulfo-oxydation, méthanotrophie, autotrophie, *Bathymodiolus azoricus*, fermentation