



THESE / UNIVERSITE DE BREST
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BREST
Mention : Microbiologie
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par
Nathalie byrne

Préparée à l'Unité Mixte de recherche (UMR 6197)
Université de Bretagne Occidentale
Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

« Etude de la diversité
métabolique des micro-
organismes des sources
hydrothermales
océaniques »

Thèse soutenue le 9 décembre 2008

devant le jury composé de :

Daniel Prieur
Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *président*

Philippe Normand
Directeur de Recherche CNRS, Université Claude Bernard Lyon II / *rapporteur*

Bernard Ollivier
Directeur de Recherche IRD / *rapporteur*

Marc Strous
Professeur, Radboud University Nijmegen, The Netherlands / *examineur*

Georges Barbier
Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *examineur*

Anne Godfroy
Directrice de Recherche, Ifremer Brest, Directrice de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes avec le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je remercie tout d'abord les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail de thèse, en particulier les rapporteurs Messieurs Bernard Ollivier, Directeur de Recherche à l'IRD et Philippe Normand, Directeur de Recherche au CNRS qui ont également suivi ce travail depuis le début. Mes remerciements s'adressent également aux examinateurs ; aux professeurs Marc Strous, Georges Barbier et Daniel Prieur pour leur participation à ce jury de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Madame Anne Godfroy, qui a encadré mes travaux durant cette thèse. Merci pour ton soutien quotidien, ton immense disponibilité je t'adresse mes plus vifs remerciements, merci de m'avoir fait confiance tout au long de ces trois années et de m'avoir toujours encouragée dans mes travaux et plus encore...

Je voudrais également remercier Daniel Prieur, de m'avoir permis de faire cette thèse, et d'avoir toujours cru à la découverte de ces petites bactéries anammox!

Joel Querellou, merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Anne Godfroy et Daniel Prieur je tenais à vous remercier de m'avoir permise de participer à une mission océanographique et à de nombreux congrès.

My thanks also goes to the lab in Nijmegen and particularly Marc Strous, Markus Schmid, Boran Kartal and Mike Jetten who I will always remember for their kindness ,their scientific collaboration, their perseverance in our work together and above all their support when things were difficult,for this I will always be grateful.

Merci à toutes les personnes du laboratoire qui ont directement ou indirectement concouru à la réalisation de ce travail, pour leur conseil, leur simplicité, et leur bonne humeur.

Je voudrais exprimer mes plus vifs remerciements à Françoise Lesongeur qui m'a fait partager ses connaissances en microbiologie et biologie moléculaire. Merci pour ton soutien, ton aide dans mes manipulations, la relecture de mon manuscrit, ton oreille attentive et pour tous les bons moments partagés avec toi dans le bureau pendant cette dernière année.

Une mention toute particulière pour Jean-louis Birrien (mon « Jean-Lou »), merci pour ton accueil au laboratoire, tes explications sur Anammox et son histoire au labo, nos premières manip pression ensemble, ton enthousiasme et ton sourire permanents, ton soutien sans faille, et puis ça fait bien longtemps que je ne suis pas faite « traiter » de truffe ou de buse....ça me manque !

Karine et Frédérique, merci beaucoup de votre aide lors de mes dernières manip en PCR quantitative. Un très grand merci pour la relecture et les corrections de mon introduction de thèse, merci d'avoir pris le temps. Votre soutien m'a beaucoup touchée.

Patricia, Josiane et Christine merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur quotidienne.

Merci aux étudiants que j'ai pu encadrer de près ou de loin, Valentin, tu es quelqu'un que j'ai appris à connaître et que je respecte beaucoup, tes grandes théories vont me manquer, je te souhaite une bonne continuation de thèse et je te confie ma marraine.

Mathilde, heureusement que je termine ma thèse, nous n'aurions pas pu rester dans le même bureau, trop bavardes !!! Merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Bonne continuation scientifique...

Lucile et Marie, que de regrets de ne pas vous avoir connu ou rencontré plus tôt, chaque moment avec vous est un moment de bonheur. On a encore plein de bons moments à passer ensemble. Marie continue à développer ce côté artistique qui est en toi, Lucile arrête un peu les travaux tu vas t'épuiser....

Jessica, il faudrait un manuscrit de thèse rien que pour toi, déjà 4 années que l'on se connaît, qu'on rale, qu'on rigole, qu'on pleure (enfin surtout moi), je n'oublierai pas tous ces moments partagés avec toi, et il y en aura encore beaucoup. Merci à ce fameux rugbyman japonais Mr Yamamoto qui nous a tant fait rire, c'est sur quelle idée d'oublier son vélo, d'avoir cassé son auto et etc... Merci de t'être occupée de moi, je prends maintenant le relais, et puis courage tu es sur la bonne voie, encore quelques moments difficiles mais c'est bientôt fini....Un grand merci à tes parents et t'inquiètes je réglerai ma facture....

Nadège et Mélusine, merci de m'avoir pris sous votre aile quand je suis arrivée au labo, d'avoir répondu à toutes mes questions, vous avez été là pour moi dans les bons moments et les moins bons, merci pour votre amitié.

Jeannette, Claire, Joelle, Marine, merci de m'avoir accueillie à l'AFSSA lors de mes débuts dans la recherche et de m'avoir toujours soutenue...j'ai vraiment passé des moments merveilleux. Laurent merci pour les chocolats, les plantes, ils m'ont bien tenus compagnie pendant la rédaction.

Et bien sur je remercie toutes les personnes que j'ai cotoyé depuis mon arrivée à Brest, mes amis de maîtrise Camille, Delphine, Ludivine, Jean-Marie, Alex, Laurent et Esterine, on a passé de vraiment bons moments ensemble. Estérine tiens bon c'est bientôt la fin. L'équipe de rugby, merci les filles vous m'avez beaucoup apporté, Ysa je viendrai te voir à Paris un jour, Gwenn, je deviens ta plus

grande fan, attention le prochain concours je fais la pom pom girl !! Bonne idée cette coloc. Julien, merci de ton soutien, profites bien de ton séjour en Irlande...

Elodie, la découverte de l'université, on l'a vécue ensemble, tous ces moments partagés restent inoubliables. Ton amitié toujours présente malgré mon départ précipité pour la Bretagne est très touchante et importante. Continues à profiter de la vie. Bon courage pour ta soutenance, je serai là...

Ma sœur « chérie », partie sur un autre continent, que de bons moments passés avec toi, j'ai été vraiment heureuse de ce rapprochement géographique, continues à profiter comme tu sais si bien le faire, merci pour tout et prends soin de toi.

Luc, merci de ta présence, de ton aide, de ta compréhension, de tous ces moments partagés avec toi....pour le reste il n'y a pas de mots à écrire sur ce manuscrit...

Mes parents, je vous dois beaucoup, merci de votre soutien quotidien, des discussions sans fin, des relectures et corrections, j'ai toujours eu besoin de vous, maman promis je vais faire attention aux « s » que j'oublie tout le temps... Dad merci pour tes traductions de dernières minutes, merci pour tout cet amour qui m'entoure, je vous aime aussi très fort. Votre Biboundé

...

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	7
Revue bibliographique	17
1. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds	19
1.1. Contexte géologique général et localisation	19
1.2. Géochimie et Minéralogie	22
1.3. Les sites hydrothermaux de la Dorsale Médio- Atlantique : Caractéristiques géologiques et biologiques.	23
2. Diversité des procaryotes	30
2.1. Diversité métabolique : besoins énergétiques et métabolisme cellulaire chez les procaryotes	31
2.2. Diversité phylogénétique et métabolique des micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles	34
3. Les communautés microbiennes des écosystèmes hydrothermaux	39
3.1. Les différents compartiments microbiens :	40
3.2. Des communautés microbiennes hydrothermales très diverses	41
4. Fonctionnement des principaux cycles biogéochimiques : Généralités et cas du pôle chaud de l'écosystème hydrothermal	53
4.1. Le cycle du Fer	53
4.2. Le cycle de l'Azote	56
4.3. Le cycle du Carbone	69
4.4. Le cycle du Soufre	75
Matériel et Méthodes	81
1. Recherche de micro-organismes anammox dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds	83
1.1. Echantillons	83
1.2. Etude moléculaire	84
1.3. Recherche de lipides laddéranes	87
1.4. Recherche de l'activité anammox par marquage isotopique.	87

2. Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des édifices hydrothermaux actifs : Approche culturale en bio-réacteur gas lift	88
2.1. Cheminée hydrothermale et échantillonnage	88
2.2. Approche culturale en bio-réacteur	88
2.3. Conditions de culture et d'enrichissement	92
2.4. Techniques moléculaires d'étude de la diversité microbienne de l'échantillon de cheminée et des cultures d'enrichissement	95
2.4.1. Extraction de l'ADN total	95
2.4.2. Amplification des gènes par PCR (Polymerase Chain Reaction)	96
2.4.3. Clonage-Séquençage	96
2.4.4. Analyse phylogénétique	97
2.4.5. Etude des communautés microbiennes par PCR quantitative.....	97
2.4.6. Etude des communautés microbiennes par SSCP	98
2.5. Sous-culture et isolements	100
Résultats.....	103
Partie 1: Recherche de micro-organismes Anammox dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds	105
1. Introduction	107
2. Résultats	108
3. Résultats complémentaires	117
3.1. Recherche de micro-organismes Anammox dans les échantillons hydrothermaux par Hybridation Fluorescente in situ (FISH)	117
3.2. Mesures de l'activité Anammox : Principaux problèmes rencontrés et adaptation du protocole aux échantillons hydrothermaux.	119
Partie 2 : Diversité métabolique des micro-organismes des édifices hydrothermaux actifs : Approches culturales en bioréacteur	123
Etude 1 : Etude de l'effet des variations des conditions de l'environnement sur les communautés microbiennes de cheminées hydrothermales cultivées en bioréacteur.	125
1. Introduction	125
2. Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor	129
3. Résultats complémentaires : sous-cultures et isolements	155
3.1. Enrichissement de la souche affiliée aux <i>Thermococcus</i>	155
3.2. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à <i>Deferribacter. sp</i>	155
3.3. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à <i>Vulcanithermus sp</i> ..	158
3.4. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à <i>Aeropyrum. sp</i>	160
3.5. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à <i>Geoglobus ahangari</i> 160	
4. Résultats complémentaires : Etude de la dynamique de la communauté par SSCP	163
Etude 2 : Le fluide hydrothermal utilisé comme base du milieu de culture dans une culture d'enrichissement en bioréacteur.....	167

1. Diversité microbienne obtenue pour l'échantillon de cheminée MO3E1	168
2. Analyse de la diversité des micro-organismes dans la culture d'enrichissement F3.....	169
4. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à Thermococcus.....	169
<i>Conclusions</i>	<i>172</i>
<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>180</i>

Liste des Figures

Figure 1: Principe général de la tectonique des plaques d'après http://ggl.ulaval.ca/personnel/	20
Figure 2: Localisation des dorsales océaniques et des sites hydrothermaux marins étudiés par les biologistes. Les points localisent les sites hydrothermaux. Modifié d'après http://www.ifremer.fr/droep	21
Figure 3: Représentation schématique d'une source hydrothermale océanique (Baross and J.D., 1985; Jannasch and Taylor, 1985; Erauso, 1994).....	24
Figure 4: Localisation des principaux sites de la Dorsale Médio-Atlantique	25
Figure 5: Fumeur noir sur le « Black Smoker Complex » (A) et crevettes <i>Rimicaris exoculata</i> sur le site TAG (B).	26
Figure 6: Les crevettes <i>Rimicaris exoculata</i> (A) et la cheminée « Thermitière » (B) sur le site Rainbow	27
Figure 7: Edifices carbonatés caractéristiques du site Lost City.....	27
Figure 8: Modioles <i>Bathymodiolus azoricus</i> sur Lucky strike.....	28
Figure 9: Réactions métaboliques majeures d'après (Karl, 1995)	31
Figure 10: 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 d'après (Karl, 1995).....	33
Figure 11: Principaux couples d'oxydo-réduction d'après « Brock Biologie des micro-organismes » Chapitre 5 (Madigan and Martinko, 2007)	34
Figure 12: Arbre phylogénique du vivant d'après Woese modifié d'après Stetter (2006) (Stetter, 2006).....	35
Figure 13: Principales réactions du cycle du Fer d'après « Brock Biologie des micro-organismes » Chapitre 19 (Madigan and Martinko, 2007)	54
Figure 14: Diagramme du cycle de l'azote d'après Jetten (Jetten, 2008).	57
Figure 15: Compartimentation cellulaire chez les Planctomycètes : (a) <i>Pirellula</i> (e.g., <i>Pirellula staleyii</i>), <i>Isosphaera</i> (e.g., <i>Isosphaera pallida</i>) et (b) « <i>Candidatus</i> Brocadia anammoxidans, <i>Gemmata</i> (e.g., <i>G. obscuriglobus</i>). Sur ces schémas sont montrés la variabilité de la compartimentation cellulaire chez les Planctomycètes ainsi que les similitudes au niveau de leur organisation interne.	62

Figure 16: Arbre phylogénétique mettant en évidence les relations entre les espèces de bactéries anammox connues (Kuenen, 2008).....	63
Figure 17: Schéma de la structure de lipides laddéranes (Sinninghe Damste et al., 2005).....	65
Figure 18: Localisation des principaux sites et écosystèmes où ont été mises en évidence des bactéries anammox (Schmid et al., 2007).	67
Figure 19: Cycle de l'azote simplifié en milieu hydrothermal, modifié d'après Kuypers et coll. (Kuypers et al., 2003).....	68
Figure 20: Principales réactions du cycle du Carbone d'après Brock Chapitre 19 (Madigan and Martinko, 2007).....	70
Figure 21: Oxydation Anaérobie du Méthane (AOM) d'après Brock Chapitre 19, (Madigan and Martinko, 2007).....	74
Figure 22: Principales réactions du cycle du Soufre d'après Brock, Chapitre 19, (Madigan and Martinko, 2007).....	75
Figure 23: Structure du C ₂₀ -[3]-ladderane –PC-monoalkylether	87
Figure 24: Schéma du système expérimental pour la réalisation de cultures en continu avec le bioréacteur “Gas lift” (a) sonde pH; (b) contrôleur pH; (c) flacons acide et base; (d) sonde de température; (e) bain thermostaté; (f) système de balayage gazeux; (g) débitmètre gaz; (h) condenseur; (i) piège ; (j) sortie effluent gazeux; (k) réservoir de milieu de culture; (l) pompe péristaltique d'addition du milieu; (m) culture; (n) pompe péristaltique de soutirage de culture; (o) système de prélèvement; et (p) septum d'inoculation	89
Figure 25: Hybridation fluorescente in situ et coloration au DAPI de divers échantillons... 118	
Figure 26: Arbre phylogénétique représentant la position des séquences obtenues à partir de l'échantillon EXO15E1 après les enrichissements et les isollements effectués aux USA EXO15FeUS et en France EXO15FeFR. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Jukes and Cantor.....	162
Figure 27: Profils CE-SSCP de la communauté archéenne présente dans la culture d'enrichissement F1 pour les prélèvements F1T12, F1T18 et F1T20. Les témoins <i>Thermococcus sp</i> et <i>Geoglobus sp</i> sont représentés par les profils 1 et 2.....	164
Figure 28: Profils CE-SSCP de la communauté bactérienne présente dans la culture d'enrichissement F1 pour les prélèvements F2T5, F2T8 et F2T11. Les témoins <i>Deferribacter sp</i> et <i>Vulcanithermus sp</i> sont représentés par les profils 3 et 4.....	165
Figure 29: (A) Prélèvement du fluide par Pepito sur la cheminée MO3E1 sur le site Lucky Strike. (B) Bioréacteur « Baby gas-lift » à bord du Pourquoi pas ? lors de la mission Momareto 2006.....	167
Figure 30: Evolution de la densité cellulaire au cours du temps lors de la culture F3 dans le « Baby » gas-lift	168

Figure 31: Arbre phylogénétique représentant la position des séquences archéennes de l'échantillon brut MO3E1, et des isolats T20F et T27F isolés sur le milieu avec le mélange fluide hydrothermal/eau de mer, des isolats T20S et T27S isolés sur milieu SME obtenus à partir des échantillons issus de la culture en bioréacteur et de la séquence obtenue à partir des échantillons prélevés lors de la culture d'enrichissement (F3T20.12). L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Jukes and Cantor. 170

Liste des Tableaux

Tableau 1: Métabolismes microbiens possibles associés aux sources hydrothermales océaniques adapté de Karl 1995 (Karl, 1995).	41
Tableau 2: <i>Bacteria</i> isolées des sources hydrothermales océaniques profondes (modifié d'après Alain, Postec et Godfroy)	44
Tableau 3: <i>Archaea</i> isolées des sources hydrothermales océaniques profondes (modifié d'après Alain, Postec, Godfroy)	49
Tableau 4: Sondes utilisées pour la détection des organismes anammox (Jetten et al., 2005)	64
Tableau 5: Echantillons biologiques étudiés, localisation géographique et température mesurée sur le lieu du prélèvement	83
Tableau 6: Sondes utilisées lors des protocoles d'hybridation.	86
Tableau 7: Composition du milieu de culture	93
Tableau 8: Liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de fragments d'ADNr16S archéens et bactériens en vue de l'étude de diversité (ADNr16S), de la PCR quantitative, de la SSCP et du clonage. S : amorce sens ; AS : amorce anti-sens.	99
Tableau 9: Synthèse des essais d'isolement effectués pour la souche affiliée à <i>Deferribacter</i> , caractéristiques des milieux testés et résultats obtenus	157
Tableau 10: Synthèse des essais d'isolement effectués pour la souche affiliée à <i>Vulcanithermus</i> , caractéristiques des milieux testés et résultats obtenus	159

Revue bibliographique

1. Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds

L'océan profond constitue l'environnement le plus étendu de notre planète, et c'est pourtant l'un des moins étudiés. L'écosystème abyssal couvre 307 millions de km², soit les 2/3 de la surface du globe terrestre. A cause du froid et de l'absence de lumière, cet écosystème a longtemps été considéré comme l'un des plus pauvres de la planète. Cependant, cette vision d'un monde abyssal fut ébranlée à la fin des années 70 lors d'une exploration sous marine menée sur la dorsale du Pacifique au large des Iles Galápagos. C'est à 2500 m de profondeur que des géologues embarqués à bord du sous-marin américain Alvin découvrirent avec stupéfaction l'existence de communautés luxuriantes de bivalves, de vers gigantesques et autres organismes, réparties tout autour de sources chaudes (Corliss and Ballard, 1977; Lonsdale and Lawver, 1980). La découverte des sources hydrothermales océaniques profondes a bouleversé nos connaissances en océanographie biologique ainsi que notre vision de l'océan profond.

1.1. Contexte géologique général et localisation

L'enveloppe superficielle du globe terrestre, ou lithosphère, est formée de plaques relativement rigides, épaisses d'une centaine de kilomètres, flottant sur le manteau plastique (ou asthénosphère) (Figure 1). Dans le noyau terrestre, la désintégration radioactive d'éléments chimiques produit un flux de chaleur qui se dissipe vers la surface, engendrant des cellules de convection dans l'asthénosphère à l'origine du mouvement des plaques. C'est le long des frontières séparant les plaques que les phénomènes tectoniques sont les plus importants. Il existe trois types de limites :

- Les zones d'expansion du plancher océanique, ou rifts océaniques, conséquences de la remontée de magma dans les zones de convection de l'asthénosphère,
- Les zones de subduction, formées par le passage de la lithosphère océanique sous une autre lithosphère océanique ou sous une croûte continentale
- Ajoutons à ces phénomènes celui des points chauds, dus à une remontée localisée de magma à travers le plancher océanique, engendrant ainsi des séries de volcans (archipels).

La carte (Figure 2) présente une liste non-exhaustive des sites hydrothermaux étudiés jusqu'à présent et pour lesquels une faune associée a été observée. La profondeur de ces sites varie entre 700 et un peu plus de 4000 m (4200 m pour le site Ashadze sur la Dorsale Médio-Atlantique).

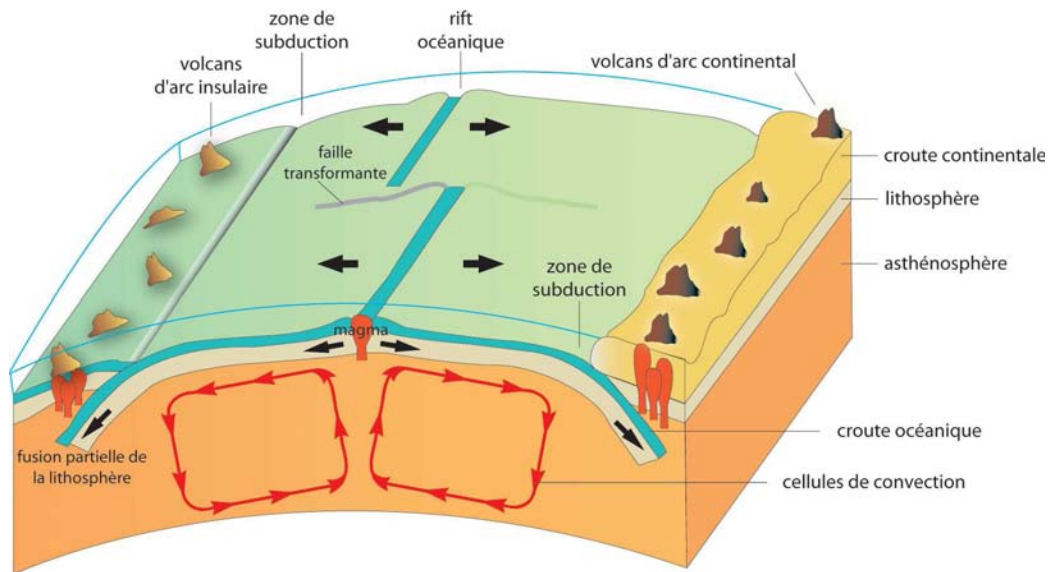


Figure 1 : Principe général de la tectonique des plaques d'après <http://ggl.ulaval.ca/personnel/>.

Les sites hydrothermaux océaniques sont situés dans des zones à forte activité tectonique, le long des dorsales médio-océaniques (Atlantique, Pacifique oriental, Océan Indien), à proximité de zones de subduction, ainsi qu'au niveau des bassins arrière-arcs du Pacifique occidental (Bassin de Lau, Bassin Nord-Fidjien, Bassin de Manus). Les sites du Pacifique ont été les plus visités, par rapport à ceux de l'océan Atlantique ou Indien. Sur une longueur totale de 60000 km, seules quelques centaines de kilomètres de dorsales ont été explorées à ce jour. A l'image des sites hydrothermaux récemment découverts dans l'océan Indien (Van Dover et al., 2001) et l'océan Atlantique (Ashadze)(Mozgova et al., 2008), de nombreux sites restent probablement à découvrir.

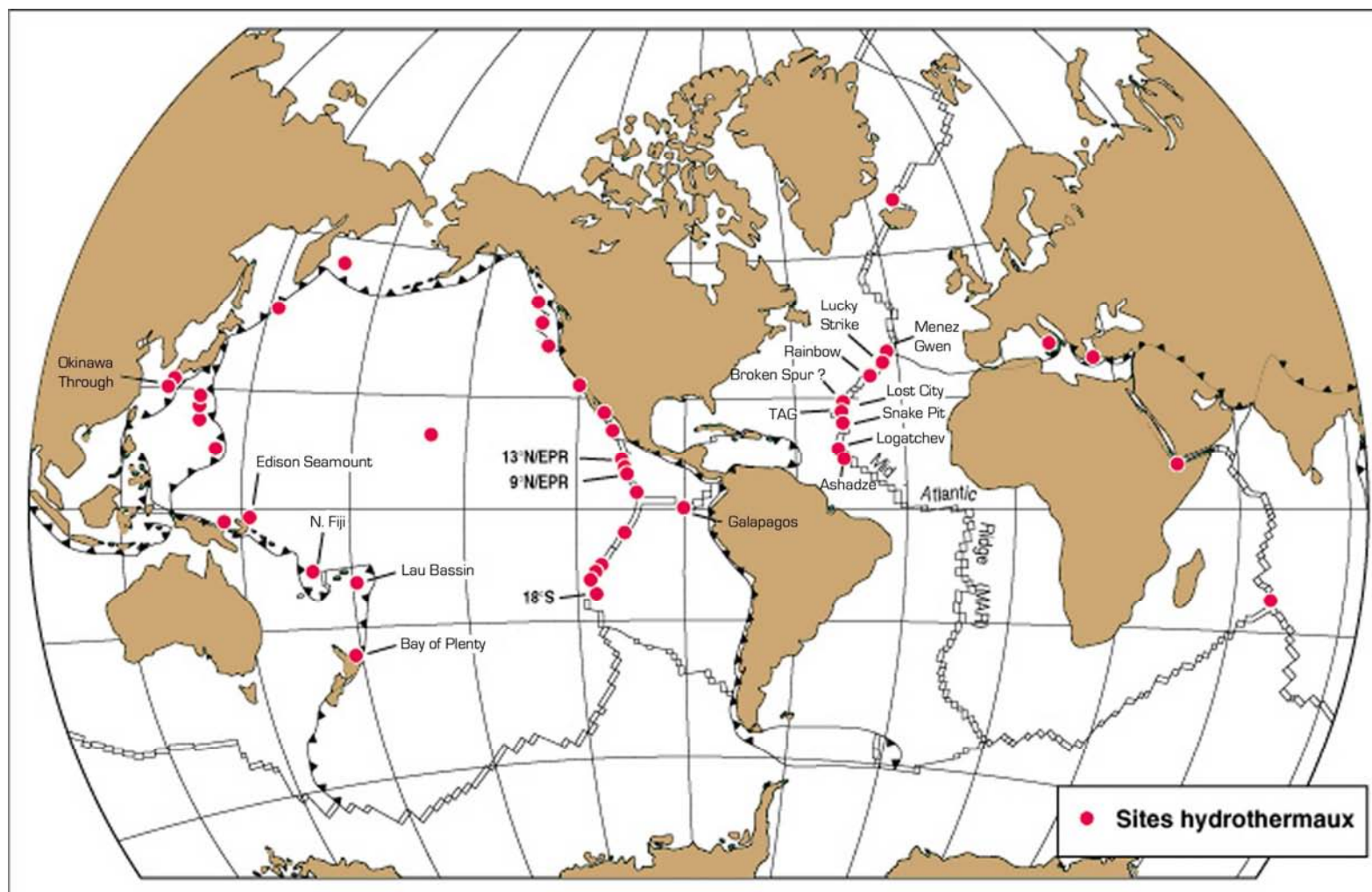


Figure 2: Localisation des dorsales océaniques et des sites hydrothermaux marins étudiés par les biologistes. Les points localisent les sites hydrothermaux. Modifié d'après <http://www.ifremer.fr/droep>

1.2. Géochimie et Minéralogie

1.2.1. Composition du fluide hydrothermal

A l'échelle d'un champ hydrothermal, l'activité tectonique des dorsales se manifeste par l'émission de fluide hydrothermal issu de la circulation de l'eau de mer à travers la croûte océanique. La composition chimique des fluides hydrothermaux est un facteur très important qui peut avoir une influence directe sur la distribution de la biocénose hydrothermale (Desbruyères et al., 2001). Plusieurs facteurs déterminent sa composition (Von Damm, 1995). La température et la pression sont deux paramètres influant largement la thermodynamique des réactions d'oxydo-réduction et donc la composition chimique des fluides hydrothermaux. Ainsi, au cours de sa circulation dans la croûte océanique, l'eau de mer rencontre une grande variété de conditions de température et de pression, influençant ses échanges avec le substrat minéral (Figure 3). La séparation de phase, c'est-à-dire l'état physique dans lequel un fluide est à la fois liquide et gazeux, est atteinte dans des conditions de température et de pression rencontrées dans la croûte océanique. Ce processus physique, à l'origine de l'enrichissement du fluide hydrothermal en chlorure de sodium, est celui ayant l'influence la plus marquée sur la composition chimique du fluide hydrothermal (Von Damm, 1995).

La composition chimique des fluides hydrothermaux est également liée à l'environnement géologique. Des sites hydrothermaux distants seulement de quelques dizaines de kilomètres peuvent émettre des fluides ayant des compositions chimiques très différentes. Par exemple, le champ hydrothermal Rainbow (36°N, MAR, 2300 m) repose sur un socle composé de roches ultramafiques issues du manteau (Fouquet et al., 1988). L'interaction du fluide hydrothermal avec ces roches (serpentinisation) libère de fortes concentrations en méthane, en hydrogène, en CO₂, en métaux et en éléments traces avec des concentrations en méthane et en hydrogène élevées (Charlou et al., 2002; Douville et al., 2002). En revanche, le champ voisin Lucky Strike (37°N, MAR, 1700 m) reposant sur un socle basaltique, est caractérisé par des fluides avec de faibles teneurs en H₂S.

Le fluide hydrothermal ainsi formé rejaillit au niveau du plancher océanique en des points focalisés constituant les sources hydrothermales. Selon la nature des roches traversées et selon le degré de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer avant son émission, la composition, la température et le débit du fluide en sortie peuvent varier d'un site à l'autre, et même selon les points d'émission, sur un même site.

1.2.2. Edification d'une cheminée hydrothermale

Après s'être infiltrée dans les fissures lithosphériques, l'eau de mer s'enfonce à plusieurs kilomètres dans la croûte océanique. Sous l'effet de la température et de la pression, le fluide change d'état physique et interagit avec la roche mère (basalte, péridotite, gabbros).

L'édification d'une cheminée hydrothermale se déroule en plusieurs étapes (Fouquet et al., 1988). Lorsque le fluide ne subit pas de dilution avec l'eau de mer, sa température au point d'émission est très élevée (350°-400°C) et son débit important. Au contact de l'eau de mer se forme une matrice poreuse de sels de sulfates, BaSO₄ (barytine) et CaSO₄ (anhydrite) à partir des ions sulfates de l'eau de mer dont le fluide est dépourvu. La paroi de l'édifice croît verticalement par dépôt des sulfures métalliques de cuivre, zinc et fer (chalcopyrite, pyrrhotite, pyrite et sphalérite) sur la surface externe. La porosité de cette paroi diminue progressivement au cours du temps, créant une séparation physique entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. La température augmente au centre de la cheminée. Des sulfures de cuivre et fer (pyrite, marcassite, pyrrhotite, chalcopyrite, isocubanite) précipitent sur la paroi interne de l'édifice pour former le conduit central. La cheminée commence à croître latéralement par remplacement progressif de l'anhydrite par des sulfures comme la chalcopyrite plus stable dans les nouvelles conditions de température de la cheminée. Dans le gradient de température ainsi créé, les minéraux s'organisent de manière concentrique, stabilisant ainsi la structure de la cheminée. La cheminée croît à la fois vers l'intérieur et vers l'extérieur. Les cheminées sont schématiquement représentées comme des structures cylindro-coniques, mais dans la réalité, ce sont des structures irrégulières présentant de nombreux canaux et cavités. Des expansions latérales ou "flanges" peuvent également se former. On estime que la durée de vie d'une cheminée peut atteindre plusieurs dizaines d'années, mais elle peut être plus courte (1 à 5 ans) sur des zones très actives telles que la dorsale du Pacifique oriental.

1.3. Les sites hydrothermaux de la Dorsale Médio- Atlantique : Caractéristiques géologiques et biologiques.

Les sites de la ride médio Atlantique (MAR) ont été visités dans les années 1980', les océanographes ne pensaient pas qu'un hydrothermalisme actif contemporain pouvait être associé à une dorsale lente (expansion de 1 à 2 cm par an contre 18 cm sur les dorsales du Pacifique) (Figure 4).

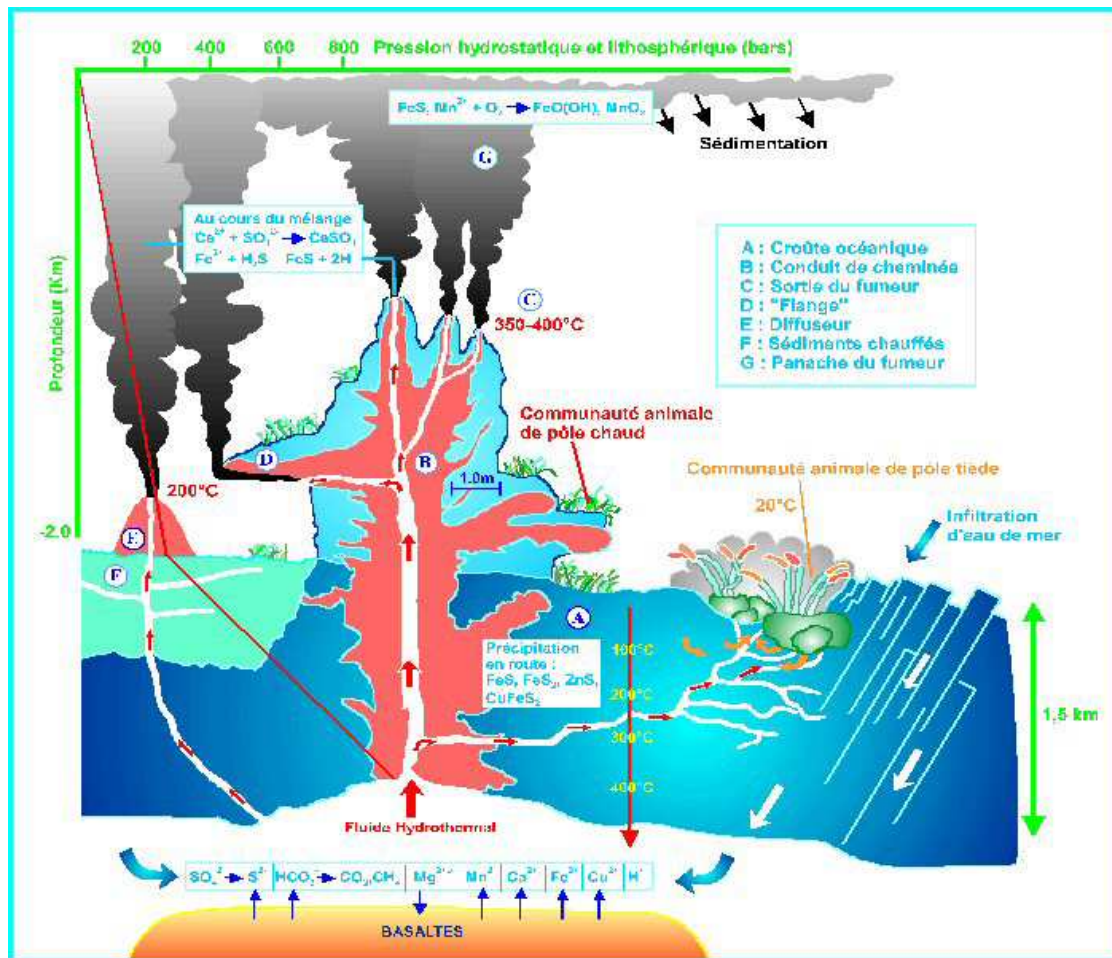


Figure 3 : Représentation schématique d'une source hydrothermale océanique (Baross and J.D., 1985; Jannasch and Taylor, 1985; Erauso, 1994).

L'exploration de cette dorsale océanique a débuté sur 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. Depuis 1985, neuf zones actives ont été étudiées sur la ride Médio Atlantique avec du Nord au Sud : Ménez-Gwen, Lucky Strike, Rainbow, Broken Spur, Lost City, TAG, Snake Pit, Logatchev, Liliput et plus récemment Ashadze (Charlou et al., 2000; Pimenov et al., 2000; Charlou et al., 2002; Douville et al., 2002; Kelley et al., 2005; Perner et al., 2007). Les conditions environnementales qui caractérisent les sites hydrothermaux des sites de l'Atlantique sont très différentes d'un site à l'autre. Ces différences sont liées d'une part aux variations observées dans les profondeurs le long de l'axe et à la nature des roches. Les zones les plus profondes (>4000 m) sont relativement stables. Ainsi une activité hydrothermale de 26000 ans a 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., 2001). Le Fe et le Mn sont les métaux de transition les plus abondants dans les fluides hydrothermaux des sites de l'Atlantique. La variabilité de la composition du fluide serait largement influencée par la séparation de phase à haute température et à la nature des roches.

La plupart des sites hydrothermaux MAR reposent sur une sous-couche basaltique. Toutefois, 3 sites hydrothermaux reposent sur des roches du manteau terrestre (roches ultramafiques) : Logatchev, Rainbow et Ashadze. Les fluides de ces sites présentent des concentrations en CH₄ et en H₂ élevées par rapport aux fluides des sites sur substrat basaltique (Charlou et al., 2002; Douville et al., 2002).



Figure 4 : Localisation des principaux sites de la Dorsale Médio-Atlantique

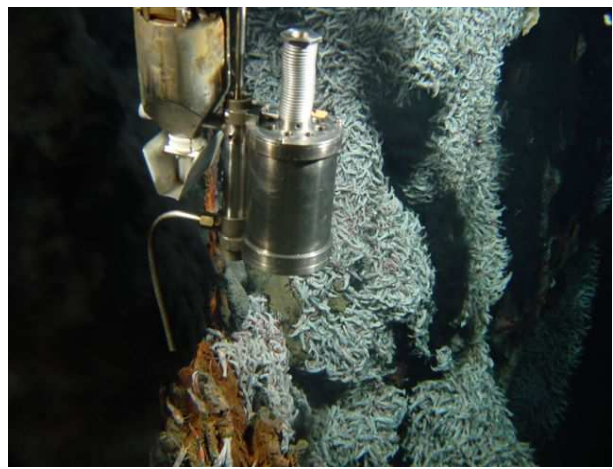
- TAG (*Trans Atlantic Geotraverse*)

Le site de TAG se situe à 26°08'N et à une profondeur d'eau d'environ 3620 m sur la croûte océanique basaltique de 100.000 ans. Les caractéristiques principales du champ de TAG ont été récapitulées par Humphris et coll (Humphris et al., 1995). Le segment volcanique TAG a la morphologie d'un sablier (Purdy et al., 1990; Sempere et al., 1990) se rétrécissant et

remontant vers le centre du segment. A 26°10'N, la largeur du plancher de la vallée est d'environ 6 à 9 kilomètres. A cet endroit la vallée du rift forme un dénivelé de 2000 m de profondeur. Le mont hydrothermal actif « Black Smoker Complex » appartient à une vaste zone sur laquelle plusieurs monts de dimensions similaires mais plus anciens et inactifs ont été localisés. A des zones d'activité de basse température correspondant à l'émission de fluide dilué sont associées des dépôts d'oxyde de manganèse (Rona, 1984). La faune hydrothermale est dominée par la crevette *Rimicaris exoculata*. La présence de vers polychètes et d'anémones par exemple a été reportée (Rona et al., 1986). L'activité biologique est grossièrement corrélée au gradient hydrothermal (Figure 5).



(A)



(B)

Figure 5: Fumeur noir sur le « Black Smoker Complex » (A) et crevettes *Rimicaris exoculata* sur le site TAG (B).

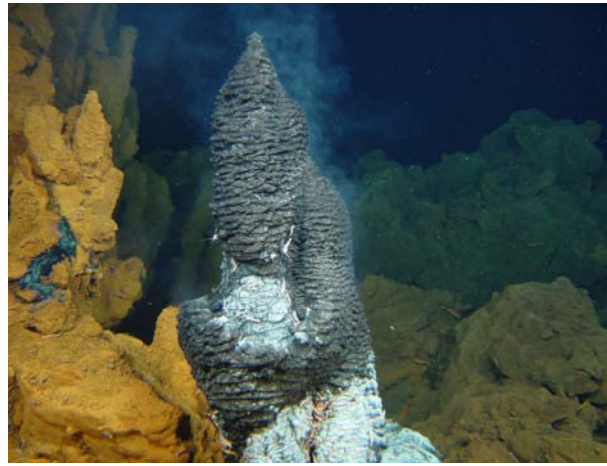
- Rainbow

Le champ hydrothermal Rainbow (36°13,80' N) situé sur le segment nord de la dorsale médio-atlantique est la plus profonde des zones actives (2270 et 2320 m) du point triple des Açores. Le champ hydrothermal couvre une surface de 250 m x 60 m (Fouquet, 1997). Il est situé à l'intersection de la ride et d'une faille non-transformante ; des roches ultrabasiques y affleurent et seule une veine de basalte située à un kilomètre à l'est du champ hydrothermal a pu être localisée (Fouquet, 1997). Ce contexte ultrabasique et les processus de séparation de phase conduisent à un enrichissement des dépôts en cuivre et en zinc ainsi qu'à des fluides chauds (360° C) de forte chlorinité (> 750 mmol/kg), de faible pH (< 3), très enrichis en gaz (par exemple, CH₄ jusqu'à 2,2 mmol/kg (Donval et al., 1997) mais relativement pauvres en H₂S (< 2.5mmol/kg (Charlou, 1997)). Le mélange de ce fluide surchauffé avec l'eau de mer

environnante dont la température est de 3,76°C provoque une intense précipitation minérale (Figure 6).



(A)



(B)

Figure 6: Les crevettes *Rimicaris exoculata* (A) et la cheminée « Thermitière » (B) sur le site Rainbow

- Lost City

Le site de Lost City est situé à 750 m de profondeur, il a été découvert en 2000 par les équipes américaines (Von Damm, 2001). Ici c'est la dislocation du massif qui a conduit à l'exportation de roche ultramafique riche en magnésium. La circulation du fluide dans le massif est conditionnée par des réactions de serpentinisation et par le refroidissement des roches du manteau.



Figure 7: Edifices carbonatés caractéristiques du site Lost City

Ces réactions entraînent des conditions de pH alcalin (pH compris entre 9 et 11) et des températures qui varient de 40 à 91°C. Le fluide est caractérisé par de fortes concentrations en hydrogène dissous et méthane. Le mélange entre les fluides chauds à pH élevé entraîne la précipitation de carbonates et la formation de surprenantes cheminées blanches qui s'élèvent à 60 m de hauteur (Figure 7).

- Lucky Strike et Ménez Gwen

Les sites de Lucky Strike et Ménez Gwen situés respectivement à 37°18'N et 37°50'N ont été découverts en 1993 et 1994 lors des campagnes FAZAR et DIVA1. Ces deux systèmes sont relativement peu profonds comparés aux autres sites de la dorsale médio-Atlantique avec des profondeurs de 1700 m et 850 m respectivement.

Dans le segment Lucky Strike (37° N à 37°35' N), la vallée axiale est large (~15 km) et profonde (~ 950 m). Au centre de cette vallée se trouve un volcan composite qui forme un haut topographique d'environ 430 m d'altitude et de 13 km de long sur 7 km de large. Ce volcan est divisé en deux parties par une vallée axiale orientée N-S ; la partie occidentale est composée de trois cônes volcaniques entourant un lac de lave d'environ 300 m de diamètre et présentant des laves très fraîches. Le champ hydrothermal Lucky Strike, qui encercle ce lac, est l'un des champs hydrothermaux les plus étendus connus actuellement dans l'océan atlantique. Ses caractéristiques principales sont une profondeur relativement faible (~ 1700 m) et le contrôle du système hydrothermal par ce lac de lave (Fouquet, 1997; Charlou et al., 2000).



Figure 8: Modioles *Bathymodiolus azoricus* sur Lucky strike

Les fluides hydrothermaux dont la température est comprise entre 170°C et 324° C ont de faibles teneurs en H₂S (< 3 mmol/kg), en métaux ainsi qu'une forte concentration en baryum et en gaz (CH₄ jusqu'à 0,85 mmol/kg). La chlorinité du fluide est voisine de celle de l'eau de mer (500-520 mmol/kg). Les caractéristiques des fluides (température, chlorinité et teneur en gaz) sont variables selon les sites. Au contraire, les fluides de Ménez Gwen sont clairs avec une température d'émission relativement uniforme de 285°C, et des chlorinités inférieures à celles de Lucky Strike.

La faune sur ces deux sites est dominée par la modiole *Bathymodiolus azoricus* qui forme des moulières importantes (Figure 8). De nombreux poissons profonds, comme les requins ou les chimères, rôdent autour des sites où ils viennent se nourrir. Des tapis importants de bactéries filamenteuses peuvent couvrir les parois des édifices hydrothermaux et les assemblages de moules.

1.4. Découverte des micro-organismes associés aux sources hydrothermales

Les premières études portant sur les micro-organismes associés aux sources hydrothermales remontent aux années 1980, avec notamment l'enrichissement et l'isolement de trois micro-organismes sulfo-oxydants appartenant au domaine des Bacteria et issus de sources hydrothermales des Galapagos (Ruby et al., 1981). La même année, une activité chimio-autotrophe fut mise en évidence dans le trophosome du vers *Riftia pachyptila* (Felbeck, 1981). Par la suite, les études de microbiologie, avaient permis d'établir le rôle des micro-organismes dans la chimiosynthèse (Baross et al., 1982; Jannasch, 1985) en tant que producteurs primaires notamment dans le cadre d'associations symbiotiques avec la macrofaune (Cavanaugh et al., 1981; Felbeck, 1981) et d'expliquer ainsi le développement des communautés animales de fortes densités au voisinage des émissions de fluides malgré la présence de conditions physico-chimiques à priori peu propices à la vie (température élevée, présence d'éléments toxiques).

Parallèlement à la découverte des sources hydrothermales les microbiologistes commençaient à isoler et à décrire des micro-organismes thermophiles provenant essentiellement des écosystèmes chauds terrestres et littoraux (Brock et al., 1972; Zeikus and Wolfe, 1972; Stetter et al., 1981; Jones et al., 1983; Kawasumi et al., 1984; Fiala and Stetter, 1986; Huber et al., 1986; Lauerer et al., 1986; Zillig et al., 1986). Dans ce contexte il a été assez rapidement admis par la communauté scientifique que les sources hydrothermales abyssales étaient propices à l'isolement de microorganismes hyperthermophiles qui constituaient une source

potentielle d'enzymes thermostables utiles au développement d'applications industrielles (Deming, 1986; Ng and Kenealy, 1986). Les premières espèces hyperthermophiles hydrothermales décrites sont :

Methanococcus jannaschii, autotrophe méthanogène (Jones et al., 1983) isolée à partir d'échantillons du bassin de Guaymas,

- *Staphylothermus marinus*, une *Archaea* hétérotrophe anaérobie sulfo-réductrice isolée d'une source hydrothermale de la Ride du Pacifique Oriental (Fiala et al., 1986)

- et deux souches S et SY, hétérotrophes anaérobies sulfo-réductrices, hyperthermophiles appartenant au genre *Desulfurococcus* (Jannasch et al., 1988).

Depuis le nombre de micro-organismes décrit n'a cessé de croître. Nous reviendrons sur la description de ces communautés microbiennes dans la partie 2.2 de ce chapitre.

2. Diversité des procaryotes

Il est désormais établi que les procaryotes dominent la biosphère. Partout où il y a de la vie, il y a des procaryotes. Ces derniers, prospèrent dans les habitats trop froids, trop chauds, trop salés, trop acides ou trop alcalins pour n'importe quel eucaryote. Les procaryotes sont des organismes microscopiques mais leur activité a une incidence colossale sur la Terre et les organismes qu'elle abrite.

Les procaryotes assurent entre autre le recyclage du carbone et d'autres éléments chimiques essentiels. Si les procaryotes «disparaissaient », les cycles biogéochimiques qui entretiennent la vie s'arrêteraient et toutes les formes de vie eucaryote s'éteindraient.

Bien qu'invisibles à l'œil nu, les procaryotes n'en sont pas moins abondants dans la biosphère. Leur nombre total est estimé entre 4×10^{30} et 6×10^{30} cellules, ce qui correspond en termes de carbone à plus de la moitié du carbone total contenu dans les plantes (Whitman et al., 1998b). On les retrouve aussi bien dans les environnements aquatiques, terrestres, souterrains ou aériens, qu'en étroite association avec des eucaryotes (Whitman et al., 1998a). Les procaryotes sont responsables des transformations essentielles au fonctionnement de la biosphère. Ainsi grâce aux réactions d'oxydo-réduction qu'ils catalysent, les procaryotes influencent ou initient les cycles biogéochimiques des éléments majeurs tels que le carbone, le soufre, l'azote et le fer. Au sein des écosystèmes, ils peuvent être des producteurs primaires, constituant le premier maillon de la chaîne trophique, ou encore jouer le rôle de décomposeurs, responsables de la reminéralisation de la matière organique. Outre l'importance vitale des micro-organismes dans la biosphère, ceux-ci ont parfois un impact

majeur dans des secteurs comme l'agro-alimentaire, l'agriculture, la santé, et l'environnement. On sait par exemple que les micro-organismes présents dans les rizières contribuent au quart des émissions mondiales de méthane, un des principaux gaz à l'origine de l'effet de serre et du réchauffement climatique. Aujourd'hui, le rôle primordial des procaryotes dans la biosphère ne fait aucun doute. Cependant en terme de diversité spécifique, les 7100 espèces de procaryotes décrites à ce jour (Achtman and Wagner, 2008) représentent une part quasiment négligeable du nombre total d'espèces vivantes connues. Les différentes estimations du nombre total d'espèces procaryotiques indiquent également que nous n'en connaissons qu'une infime partie (0,05 à 10 % selon l'écosystème considéré) (Amann et al., 1995).

2.1. Diversité métabolique : besoins énergétiques et métabolisme cellulaire chez les procaryotes

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques se déroulant dans une cellule. C'est un processus faisant intervenir des processus de dégradation (catabolisme) et de synthèse organique (anabolisme) (Figure 9).

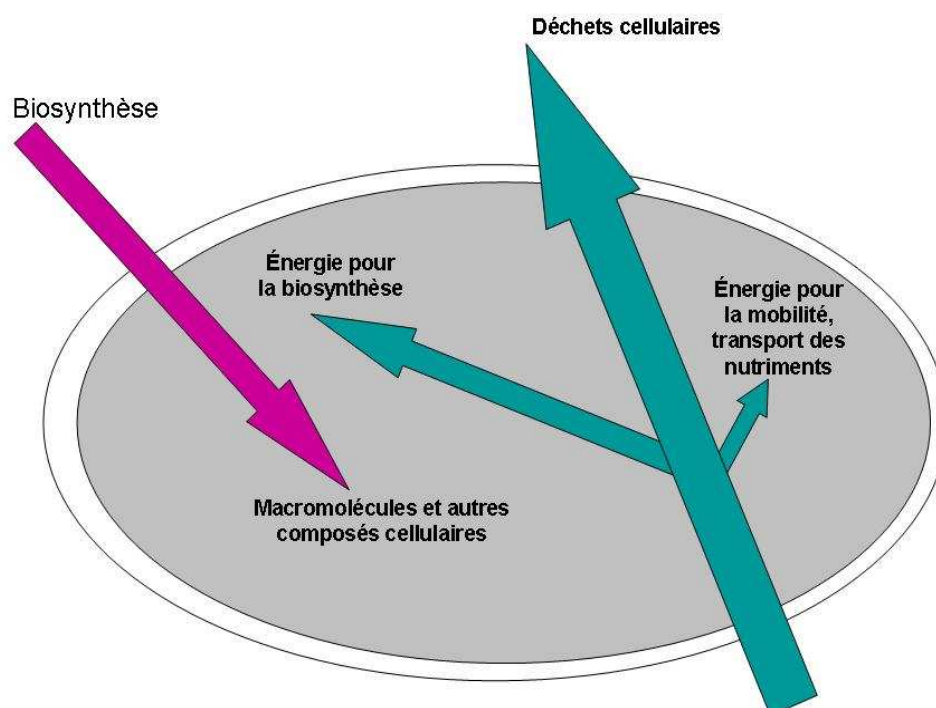


Figure 9 : Réactions métaboliques majeures d'après (Karl, 1995)

Tous les organismes cellulaires possèdent un métabolisme particulier. Les cellules utilisent les nutriments de leur environnement et les transforment. Elles conservent une part de l'énergie

présente dans ces substances sous une forme assimilable et les éléments nécessaires à la synthèse de macromolécules puis elles éliminent les déchets.

On peut classer les procaryotes selon la manière dont ils se procurent de l'énergie et du carbone (Figure 10). Les deux voies de production d'énergie sont la phototrophie et la chimiotrophie.

La **phototrophie**, c'est-à-dire l'utilisation de l'énergie lumineuse comme source d'énergie est largement répandue chez les procaryotes. Les organismes phototrophes, capables de réaliser la photosynthèse sont souvent également autotrophes c'est-à-dire capable d'utiliser le CO_2 comme source de carbone. Il existe également des micro-organismes photohétérotrophes qui utilisent une source de carbone organique. Grâce à des pigments photosensibles (chlorophylle) ou bacteriochlorophylle, les micro-organismes utilisent l'énergie lumineuse pour produire de l'ATP. Chez les bactéries, la photosynthèse est souvent anoxygénique, en effet les donneurs d'électrons nécessaires à la régénération des NAD^+ ou NADP^+ sont des composés inorganiques autres que l' H_2O (production d' O_2) tels que H_2S , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.

Les micro-organismes **chimiotrophes** utilisent une source d'énergie chimique. On distingue dans ce groupe, les chimio-organotrophes qui obtiennent leur énergie grâce à l'oxydation des composés organiques, l'énergie s'accumule dans la cellule sous forme de composés riches en énergie (ATP, acétylphosphate, acétyl-CoA, PEP) et les chimio-lithotrophes quant à eux tirent leur énergie de l'oxydation de composés inorganiques réduits tels que le fer (Fe^{2+}), l'ammonium (NH_4^+), le dihydrogène (H_2) ou l'hydrogène sulfuré (H_2S).

La **chimioorganotrophie** est le métabolisme le plus commun au sein des micro-organismes, la croissance en chimioorganohétérotrophie se produit souvent en condition aérobie avec l'oxygène (O_2) comme accepteur terminal d'électrons. Cependant, en absence d'oxygène, la croissance est possible, par fermentation ou par utilisation d'un autre accepteur terminal d'électrons tels que NO_3^- , NO_2^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} ou S^0

Dans tous les environnements marins, les sulfates SO_4^{2-} sont présents à de fortes concentrations et représentent en absence d'oxygène l'accepteur d'électron préférentiel.

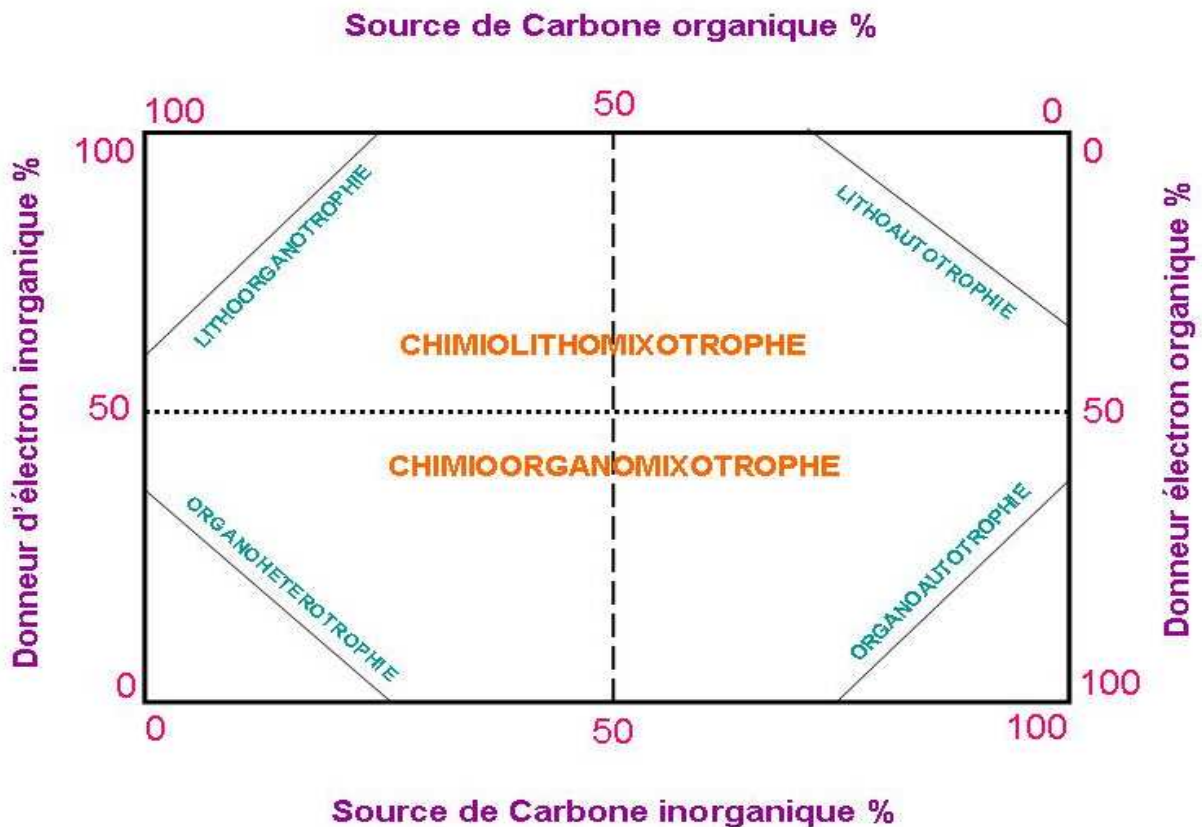


Figure 10: Diversité des métabolismes chimiotrophes. La croissance des procaryotes en fonction des donneurs d'électrons organiques ou inorganiques est exprimée comme des pourcentages variables d'énergie totale et de carbone nécessaire. Modifié d'après (Karl, 1995).

Les micro-organismes chimioorganohétérotrophes peuvent utiliser une large gamme de composés organiques pour leur croissance. Par exemple, un cas extrême est représenté par certaines bactéries du genre *Pseudomonas*, qui peuvent se développer sur plus de 80 composés organiques différents (Stanier et al., 1966). A l'opposé certains micro-organismes ne peuvent utiliser qu'un ou deux composés organiques comme source d'énergie et de carbone (Smith and Hoare, 1977). Un autre avantage du métabolisme chimioorganohétérotrophe est la capacité des organismes à utiliser plus d'un substrat à la fois grâce à des voies métaboliques variées. Certains procaryotes ont la capacité à mettre en œuvre outre un métabolisme chimioorganohétérotrophe un métabolisme énergétique chimio-lithotrophe et d'utiliser le CO₂ comme source de carbone (autotrophie).

La chimiolithotrophie

Les micro-organismes chimiolithotrophes utilisent des substances inorganiques comme source d'énergie. Les chimiolithotrophes obligatoires ont nécessairement besoin de composés

inorganiques réduits comme source d'énergie pour pouvoir se développer. De nombreux micro-organismes chimiolithotrophes obligatoires sont capables d'utiliser le carbone inorganique (CO, CO₂ par exemple) comme unique source de carbone. D'autres procaryotes sont capables d'utiliser une large gamme de substances organiques en plus ou à la place de composés inorganiques. Les principaux donneurs d'électrons sont H₂, Fe²⁺, H₂S S⁰. La figure 11 ci-dessous présente les couples d'oxydo-réduction et les potentiels redox associés.

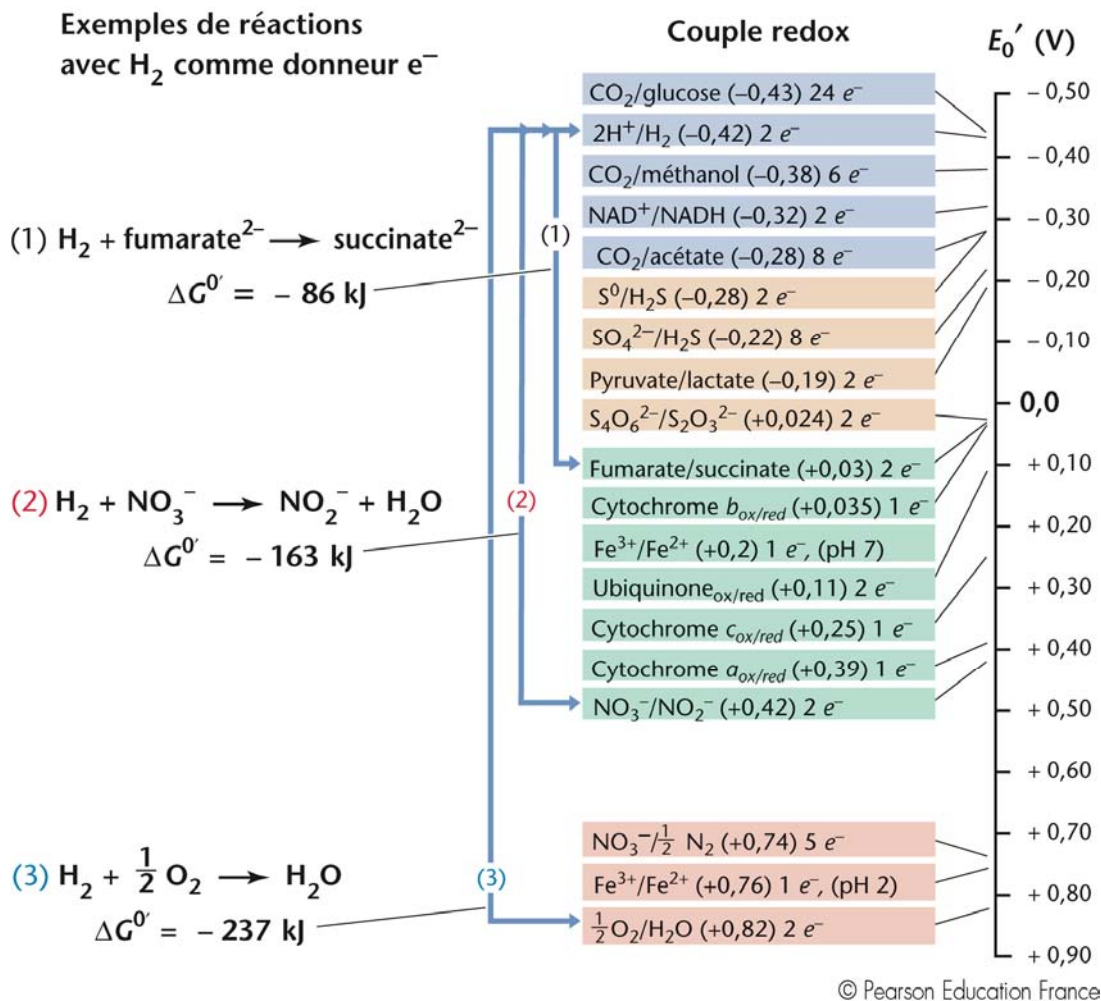


Figure 11: Principaux couples d'oxydo-réduction d'après « Brock Biologie des micro-organismes » Chapitre 5 (Madigan and Martinko, 2007)

2.2. Diversité phylogénétique et métabolique des micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles

La découverte des procaryotes hyperthermophiles à la fin des années 1970 coïncide avec la découverte de l'existence du domaine des Archaea, « le troisième domaine du vivant », grâce aux travaux pionniers de Karl Woese (Woese and Fox, 1977; Woese et al., 1990). Les micro-

organismes procaryotes thermophiles et hyperthermophiles isolés des zones d'activités géothermales terrestres et marines appartiennent aux deux domaines *Bacteria* et *Archaea*. Ces procaryotes présentent des caractéristiques physiologiques et métaboliques très diverses et interviennent dans la plupart des grands cycles biogéochimiques, notamment celui du soufre.

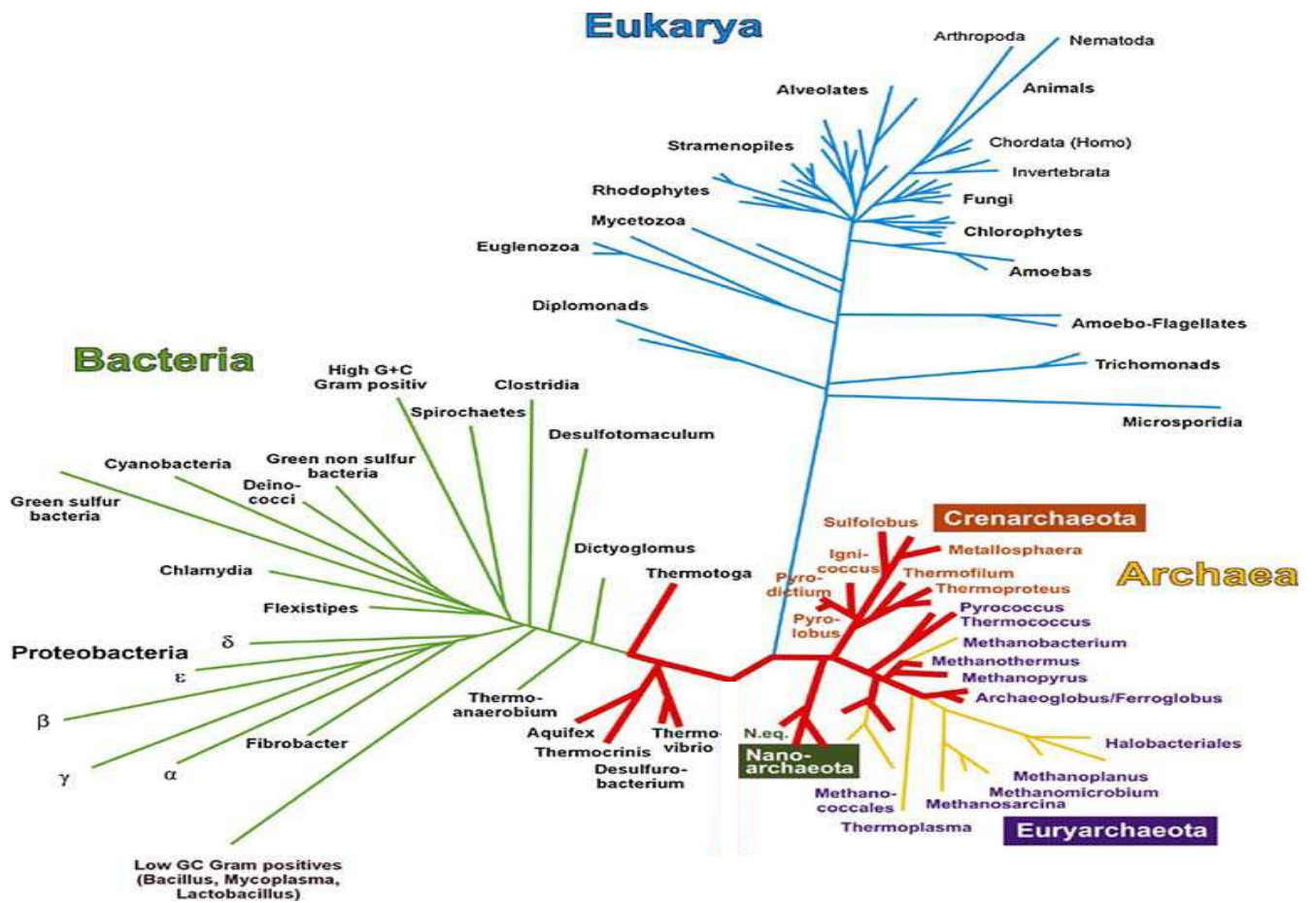


Figure 12: Arbre phylogénétique du vivant d'après Woese modifié d'après Stetter (2006) (Stetter, 2006).

2.2.1. Les *Bacteria*

Les micro-organismes thermophiles au sein du domaine des *Bacteria* appartiennent à plusieurs lignées. Certaines lignées comportent à la fois des espèces mésophiles et des espèces thermophiles alors que trois lignées positionnées à la base de l'arbre phylogénétique des *Bacteria* ne comportent que des espèces thermophiles et hyperthermophiles.

Au sein des Cyanobactéries on trouve quelques espèces thermophiles dont les représentants les plus thermophiles sont des espèces des genres *Chloroflexus* et *Synechococcus*, qui sont pour certaines espèces des thermophiles modérés phototrophes bien représentés dans les systèmes hydrothermaux terrestres (Ferris et al., 1996). Au sein des bactéries Gram positives un certain nombre d'espèces thermophiles appartenant à l'ordre des *Bacilliales* ou celui des *Clostridiales* ont été décrites telles les espèces des genres *Thermoanaerobacterium*, *Caminicella*, et *Tepidibacter* (Liu et al., 1996; Alain et al., 2002b; Slobodkin et al., 2003; Fardeau et al., 2004; Urios et al., 2004a; Kublanov et al., 2007). Ces organismes sont des fermentaires anaérobies. Des espèces appartenant au groupe Thermus-Deinococcus, telles que les espèces des genres *Thermus*, *Rhodothermus*, *Meiothermus*, *Vulcanithermus* et *Oceanithermus* ont été isolées aussi bien d'environnements chauds continentaux que marins (Brock and Freeze, 1969; Alfredsson et al., 1988; Sako et al., 1996; Miroshnichenko et al., 2003c; Miroshnichenko et al., 2003d). Ces organismes sont des chimioorganotrophes aérobies. Récemment des espèces thermophiles appartenant à la classe Epsilon des protéobactéries ont été isolées d'écosystèmes hydrothermaux sous marins profonds. Ces micro-organismes, telle l'espèce *Caminibacter hydrogenophilus* sont des autotrophes anaérobies sulforéductrices réduisant le soufre, ainsi que les nitrates et/ou l'oxygène pour certaines d'entre elles (Alain et al., 2002b).

Les trois lignées (*Thermotogales*, *Thermodesulfobacteriales* et *Aquificales*), situées à la base de l'arbre des *Bacteria*, et constituées de un ou plusieurs genres principaux, comportent principalement des espèces thermophiles et hyperthermophiles anaérobies ou microaérophiles. L'ordre des *Thermotogales* comporte plus d'une vingtaine d'espèces isolées à partir d'un grande de variété d'écosystèmes chauds. *Thermotoga* et les genres proches sont des bactéries hyperthermophiles, chimioorganotrophes fermentatives, dont la température optimale de croissance se situe vers 80°C, Ces organismes ont été isolés aussi bien de sources chaudes terrestres (*Thermotoga*, *Fervidobacterium*) (Windberger et al., 1989; Huber et al., 1990b) que de sources hydrothermales côtières ou profondes (*Thermotoga*, *Thermosipho*, *Marinitoga*) (Huber et al., 1986; Antoine et al., 1997; Wery et al., 2001a; Alain et al., 2002a; Postec et al., 2005c; Nunoura et al., 2007b) que de puits de pétrole (*Petrotoga*) (Lien et al., 1998; L'Haridon et al., 2002; Miranda-Tello et al., 2004; Miranda-Tello et al., 2007) et présentent la caractéristique commune de posséder une enveloppe externe semblable à un fourreau : la « toga ». Les espèces du genre *Thermodesulfobacterium* (Jeanthon et al., 2002) et *Thermodesulfatator* (Moussard et al., 2004; Alain et al., soumis) sont des bactéries sulfato-réductrices thermophiles (optimum, 70°C) qui se positionnent comme une lignée isolée entre

Thermotoga et *Aquifex*. Les micro-organismes des genres *Aquifex*, *Persephonella* (Gotz et al., 2002; Nakagawa et al., 2003) et *Desulfurobacterium* (L'Haridon et al., 1998; Alain et al., 2003; L'Haridon et al., 2006b) sont des chimiolithoautotrophes hyperthermophiles et sont les plus thermophiles de toutes les *Bacteria* connues avec une température optimale de croissance de 85°C (Huber et al., 1992). Différentes espèces d'*Aquificales* utilisent H₂ comme donneur d'électrons (organismes hydrogénotrophes) mais peuvent également utiliser S⁰ ou S₂O₃²⁻ comme donneurs d'électrons et O₂ ou NO₃⁻ comme accepteurs d'électrons. Ces organismes qui peuvent croître jusqu'à 95°C ne tolèrent que de très faibles concentrations en O₂ mais restent (avec quelques espèces d'*Archaea*) les rares hyperthermophiles aérobies (ou plus exactement microaérophiles) connues.

2.2.2. Les *Archaea*

De nombreuses espèces thermophiles et hyperthermophiles appartiennent aux deux embranchements principaux du domaine des *Archaea* : les *Euryarchaeota* et les *Crenarchaeota*. Au sein des *Crenarchaeota*, les hyperthermophiles se regroupent à la base de l'arbre phylogénétique et comportent une majorité de micro-organismes chimiolithotrophes autotrophes et quelques espèces chimiorganotrophes. Les *Euryarchaeota* regroupent des *Archaea* hyperthermophiles physiologiquement diverses telles que les *Methanoarchaea* productrices de méthane et des espèces chimioorganotrophes. Trois autres embranchements se positionnent également dans l'arbre des *Archaea* : l'embranchement des *Korarchaeota* qui regroupe un ensemble de micro-organismes non cultivés dont le positionnement à la base de l'arbre des *Archaea*, ainsi que leur découverte dans une source chaude du parc du Yellowstone (Auchtung et al., 2006) laisse présager un caractère thermophile, les *Nanoarchaea* tel que *Nanoarchaeum equitans* (Hohn et al., 2002; Paper et al., 2007, Hohn, 2002 #1789). et les *Thaumarchaea* (Brochier-Armanet et al., 2008) récemment identifiés comme une lignée indépendante regroupant les *Crenarchaeota* mesophiles.

- Euryarchaeota hyperthermophiles

Les *Methanoarchaea* (méthanogènes) hyperthermophiles appartiennent pour la plupart à l'ordre des *Methanococcales* qui comporte 4 genres hydrogénotrophes, *Methanococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanothermococcus* et *Methanotorris* (Huber et al., 1982; Takai et al., 2002; L'Haridon et al., 2003; Takai et al., 2004b). Ces espèces ont été isolées

d'environnements hydrothermaux sous marins ou terrestres. Des espèces thermophiles appartenant à l'ordre des *Methanosarcinales*, pour la plupart acétoclastes, ont également été décrites. Les *Thermoplasmatales* comportent des organismes thermophiles parmi les plus acidophiles connus. Les espèces de l'ordre des *Thermococcales* appartiennent à 3 genres, *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Paleococcus* (Fiala and Stetter, 1986; Zillig et al., 1987; Erauso et al., 1993; Godfroy et al., 1997; Takai et al., 2000). Ce sont des hyperthermophiles qui ont été isolées de sources hydrothermales océaniques profondes et côtières, mais également des eaux de gisements pétroliers et de sources thermales continentales. Elles constituent un groupe métabolique homogène. Ce sont des chimioorganotrophes capables de se développer très rapidement sur des substrats complexes de type protéique ou des sucres, et qui réduisent le soufre élémentaire en hydrogène sulfuré. Elles sont parmi les espèces thermophiles dont la physiologie a été le plus étudiée. Le séquençage des génomes de plusieurs espèces a été réalisé.

Au sein de l'ordre des *Archaeoglobales*, les espèces du genre *Archaeoglobus* sont les seuls organismes sulfato-réducteurs au sein du domaine des *Archaea* (Huber et al., 1997; Henstra et al., 2007). Les 2 autres genres *Geoglobus* et *Ferroglobus* sont des organismes impliqués dans le métabolisme du fer (Hafenbradl et al., 1996; Kashefi et al., 2002).

- Crenarchaeota hyperthermophiles

Au sein des *Crenarchaeota*, les *Thermoproteales* et les *Sulfolobales* semblent spécifiques des habitats thermophiles terrestres alors que les organismes de l'ordre des *Desulfurococcales* semblent coloniser les habitats volcaniques sous marins. Parmi les *Sulfolobales*, les espèces des genres *Sulfolobus* et *Acidianus* ont été isolés de divers habitats volcaniques terrestres (solfatares, sources chaudes). Ce sont des espèces acidophiles, chimiolithotrophes facultatives, impliquées dans l'oxydation des composés soufrés (H_2S ou S^0) en acide sulfurique (*Sulfolobus sp.*). Par contre les espèces du genre *Acidianus* sont anaérobies facultatives et peuvent aussi bien oxyder S^0 en H_2SO_4 que le réduire en H_2S .

L'ordre des *Desulfurococcales*, regroupe une dizaine de genres qui possèdent des caractéristiques phénotypiques diverses puisqu' on y trouve des espèces chimioorganotrophes aérobies (*Aeropyrum*, *Sulfurococcus*) (Nakagawa et al., 2004a ; Karavaiko et al., 2006), anaérobies (*Hyperthermus*, *Desulfurococcus*, *Staphylothermus*, *Pyrodictium*) (Fiala et al., 1986 ; Zillig et al., 1990 ; Pley et al., 1991; Perevalova et al., 2005) ou chimiolithotrophes strictes (*Ignicoccus*, *Pyrolobus*) (Blöchl et al., 1997; Huber et al., 2000), souvent

sulforéductrices. Mais une des caractéristiques majeures de cet ordre est qu'il comporte les organismes les plus thermophiles connus à ce jour. Les espèces des genres *Pyrodictium* et *Pyrolobus* sont capables de se développer à des températures supérieures à 100°C (Stetter et al., 1983; Blöchl et al., 1997). *Pyrolobus fumarii*, isolé d'une cheminée hydrothermale de la dorsale médio-Atlantique, détient le record de température de croissance chez les procaryotes à 113°C (Blöchl et al., 1997). Les espèces des genres *Desulfurococcus*, *Staphylothermus* et *Hyperthermus* sont des espèces hyperthermophiles chimio-organotrophes qui métabolisent le soufre. Les espèces du genre *Aeropyrum* sont les rares espèces hyperthermophiles aérobies. Les espèces du genre *Ignicoccus* ont été isolées aussi bien de sources hydrothermales cotières que profondes, ce sont des organismes chimiolithoautotrophes qui utilisent S⁰ comme accepteur d'électrons. Certaines espèces du genre *Ignicoccus* présentent la particularité de vivre en association avec un petit procaryote *Nanoarchaeum equitans* (Paper et al., 2007). Cette espèce forme une lignée distincte, à la base de l'arbre des *Archaea*. Il s'agit de l'un des plus petits procaryotes connu tant de part son volume cellulaire que par la taille de son génome. L'absence dans son génome de la plupart des gènes codant pour les fonctions métaboliques classiques le rend complètement dépendant de son hôte, *Ignicoccus*.

3. Les communautés microbiennes des écosystèmes hydrothermaux

L'environnement hydrothermal, sous l'influence du mélange turbulent du fluide avec l'eau de mer, offre aux micro-organismes un vaste panel de conditions physico-chimiques. D'après nos connaissances actuelles sur les métabolismes microbiens et sur l'environnement hydrothermal, à savoir notamment les espèces chimiques présentes dans l'eau de mer ou dans le fluide hydrothermal, il est possible de lister les voies métaboliques susceptibles d'être présentes chez les micro-organismes des sources hydrothermales. (Tableau 1)

Les sources hydrothermales océaniques sont composées d'habitats nombreux et variés pour la croissance de micro-organismes chimiolithotrophes et chimioorganohétérotrophes. Il est donc inapproprié de supposer que les habitats microbiens sont fixes dans le temps ou dans l'espace. Par exemple, des analyses de température sur divers sites hydrothermaux ont mis en évidence des périodicités dans les mesures variant des secondes aux heures avec une influence tidale claire (Chevaldonné et al., 1991).

Cette situation entraîne un défi métabolique pour les micro-organismes associés et exposés à ces variations.

3.1. Les différents compartiments microbiens :

L'écosystème hydrothermal est un biotope dynamique qui offre des gradients chimiques et aussi thermiques particulièrement abrupts à l'échelle du centimètre, permettant ainsi à des micro-organismes physiologiquement très différents de cohabiter.

Différents types d'habitats des populations microbiennes peuvent être définis, (Karl, 1995):

- le fluide hydrothermal où se développent des populations sous forme libres ou attachées à des particules. Cette microflore pourrait être issue d'une biosphère souterraine sous-jacente aux cheminées hydrothermales, ce concept de biosphère souterraine étant corroboré par de récentes études (Gold, 1992; Huber et al., 2002b, , 2003; Roussel et al., 2008)
- les surfaces, que ce soit celles des dépôts hydrothermaux, des sédiments ou des animaux exposés au fluide peuvent être le support du développement de micro-organismes, notamment sous forme de biofilms (tapis microbiens)
- le panache correspondant à de l'eau de mer enrichie par les minéraux communément présents dans les fluides
- la faune hydrothermale (syboglinidés, polychètes, mollusques, crustacés) associée à une microflore par ecto, endosymbiose, ou épibiose
- les édifices hydrothermaux actifs
- les sédiments des champs hydrothermaux percolés par le fluide hydrothermal comme dans le Bassin de Guaymas.

Cette typologie demeure toutefois théorique car les micro-organismes ne sont pas nécessairement inféodés à un type d'habitat. Cependant, elle permet d'orienter les stratégies d'échantillonnages et de décrire la structure spatiale des peuplements microbiens.

Tableau 1: Métabolismes microbiens possibles associés aux sources hydrothermales océaniques adapté de Karl 1995 (Karl, 1995).

Type respiratoire	Donneurs d'électrons	Accepteurs d'électrons	Source de carbone	Processus métabolique
Aérobie	H ₂	O ₂	CO ₂	Oxydation de l'hydrogène
	HS ⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	O ₂	CO ₂	Oxydation des composés soufrés
	Fe ²⁺	O ₂	CO ₂	Oxydation du fer
	Mn ²⁺	O ₂	CO ₂	Oxydation du manganèse
	NH ₃ , NO ₂ ⁻	O ₂	CO ₂	Nitrification
	CH ₄ , CO et autres composés en C1	O ₂	CO ₂	Méthanotrophie, méthylothrophie
	[CH ₂ O] _n	O ₂	[CH ₂ O] _n	Hétérotrophie aérobie
Anaérobie	H ₂	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrification
	H ₂	S ⁰	CO ₂	Sulfo-réduction
	H ₂	SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	CO ₂	Sulfato -Thiosulfato-réduction
	H ₂	CO ₂	CO ₂	Méthanogénèse
	CH ₄	SO ₄ ²⁻	CO ₂ ou CH ₄	Oxydation anaérobie du méthane
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , Fe ³⁺	?	Oxydation anaérobie de l'ammoniac
	S ²⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrification, Sulfo-oxydation
	[CH ₂ O] _n	NO ₃ ⁻	[CH ₂ O] _n	Dénitrification
	[CH ₂ O] _n	S ⁰ , SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	[CH ₂ O] _n	Hétérotrophie, réduction de composés soufrés
	[CH ₂ O] _n	[CH ₂ O] _n	[CH ₂ O] _n	Fermentation

3.2. Des communautés microbiennes hydrothermales très diverses

En absence totale de lumière, le réseau trophique de l'écosystème hydrothermal repose presque exclusivement sur la chimiosynthèse microbienne. La mise en évidence de photorécepteurs chez une crevette hydrothermale (Van Dover et al., 1989), et de pigments photosynthétiques chez une bactérie isolée du panache d'un fumeur noir (Yurkov and Beatty, 1998) ont amené certains auteurs à émettre l'hypothèse de l'existence d'organismes pouvant convertir les radiations électromagnétiques en source d'énergie. Ces résultats sont cependant très controversés. Les micro-organismes chimiolithotrophes sont sans aucune ambiguïté les producteurs primaires de ces écosystèmes. Par définition, la chimiosynthèse désigne la fixation du CO₂ à l'obscurité, par analogie avec le terme photosynthèse (Jannasch, 1985). Ainsi, au sein de l'écosystème hydrothermal marin profond, les éléments apportés par le fluide hydrothermal (CO₂, CO, CH₄, H₂, H₂S, N₂...) et par l'eau de mer (O₂, SO₄) permettent la croissance d'organismes chimiolithoautotrophes, qui obtiennent leur énergie de l'oxydation des composés réduits apportés par le fluide hydrothermal (Jannasch, 1995; Karl, 1995).

Les conditions environnementales extrêmes : fortes pression hydrostatique et température, ainsi que les gradients physico-chimiques abrupts expliquent la grande diversité physiologique des micro-organismes isolés de cet environnement.

Les souches isolées des environnements hydrothermaux profonds représentent souvent de nouveaux taxons et le nombre d'espèces bactériennes et archéennes isolées est en constante augmentation. Celles-ci sont recensées dans les tableaux 2 et 3 présentés ci-après.

De nombreux inventaires ont été réalisés sur des échantillons de fluides hydrothermaux, de fragments de fumeurs noirs, de diffuseurs et de sédiments provenant de sites actifs et ont révélé une diversité phylogénétique très importante. Dans l'ensemble les analyses phylogénétiques portant sur les communautés archéennes présentes au niveau des cheminées hydrothermales ont révélé la présence d'une très importante diversité d'*Archaea* appartenant aux *Thermococcales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Archaeoglobales*, *Desulfuroccales* et *Ignococcales* (Takai and Horikoshi, 1999a; Reysenbach et al., 2000; Takai et al., 2001; Huber et al., 2002b; Nercessian et al., 2003; Schrenk et al., 2003; Nercessian et al., 2004). Des études récentes ont montré une évolution temporelle dans la colonisation des cheminées hydrothermales (McCliment et al., 2006; Page et al., 2008; Takai et al., 2008). A 9°N, il semblerait que les *Ignococcales* soient les premières colonisatrices (McCliment et al., 2006). Des modules de colonisation ont également été déposés sur un site du bassin de Guaymas, les études moléculaires effectuées 4 jours après leur dépôt mettent en évidence dans un premier temps une colonisation par des micro-organismes autotrophes. Cependant sur un site du Bassin de Lau, plus riche en matière organique, les premiers colonisateurs semblent être des hétérotrophes (Takai et al., 2008).

Les communautés bactériennes semblent coloniser de nombreuses niches de l'écosystème hydrothermal. Les *Epsilon Protéobacteria* sont particulièrement dominantes et diverses. Elles sont détectées dans des habitats variés : les 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; Longnecker and Reysenbach, 2001). Des *Epsilon Protéobacteria* sont également trouvées en association épi-symbiotiques avec des métazoaires (Polz and Cavanaugh, 1995; Lopez-Garcia et al., 2002). Malgré leur présence et leur distribution importantes, la physiologie de ces micro-organismes est peu connue de part la difficulté à les isoler en culture. Un autre groupe de chimiolithotrophe représenté par les *Aquificales* utilisent le même couple d'accepteurs et donneurs d'électrons que les *Epsilon Protéobacteria* (Nakagawa and Fukui, 2003). La diversité bactérienne comprend également des espèces des groupes des *Firmicutes*, *Verrumicrobia*, *Thermales* et *CFB*. Les *Verrumicrobia* ont été détectées dans de nombreux sites hydrothermaux (Alain et al., 2002c; Lopez-Garcia et al., 2002; Teske et al., 2002). Des clones de bactéries vertes non-sulfureuses ont également été trouvés dans les études de

diversité (Alain et al., 2002c; Lopez-Garcia et al., 2002; Teske et al., 2002). Plus récemment, plusieurs études ont montré la diversité des bactéries réduisant les sulfates (*SRB*) en utilisant des approches fonctionnelles (Dhillon et al., 2003; Hoek et al., 2003; Nakagawa et al., 2004b). Il a été suggéré que ces bactéries réduisant les sulfates pouvaient avoir un impact localisé sur la chimie et la minéralogie de l'environnement et jouaient un rôle sur la précipitation et l'altération des sulfures dans les écosystèmes hydrothermaux.

De nombreuses études, ont été menées au niveau des écosystèmes hydrothermaux ont permis l'isolement et la description de nouvelles espèces et de nouveaux genres appartenant aussi bien aux domaines archéens que bactériens. Pour tous ces micro-organismes, des aspects du métabolisme ont été décrits tels que les sources de carbone, les donneurs et accepteurs d'électrons, les températures optimales de croissance. Des études de diversité moléculaire du gène codant pour l'ARNr16S ainsi que l'étude de certains gènes fonctionnels ont été réalisées et ont pu apporter des informations complémentaires sur les métabolismes énergétiques. Ainsi les micro-organismes des écosystèmes hydrothermaux contribueraient au fonctionnement des grands cycles biogéochimiques. Néanmoins nos connaissances sur le fonctionnement de ces cycles dans l'écosystème hydrothermal restent incomplètes.

Tableau 2 : *Bacteria* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes (modifié d'après Alain, Postec et Godfroy)

	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° opt (°C)	Référence
<i>Aquificales</i>	<i>Persephonella</i>	<i>P. marina</i>	microaérophile, autotrophe, sulfo-thiosulfato- et hydrogeno-oxydante, dénitrifiante	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	70	(Gotz et al., 2002)
		<i>P. guaymasensis</i>	microaérophile, autotrophe, sulfo-thiosulfato- et hydrogeno-oxydante, dénitrifiante	Bassin de Guaymas, Pacifique	70	(Gotz et al., 2002)
		<i>P. hydrogeniphila</i>	microaérophile, autotrophe, hydrogeno-oxydante, dénitrifiante	Suiyo Seamount, Pacifique	70	(Nakagawa et al., 2003)
	<i>Hydrogenivirga</i>	<i>H. okinawensis</i>	Sulfo-oxydante chimolithotrophe	Yonaguni Knoll IV, Southern Okinawa Troughv	75	(Nunoura et al., 2008b)
	<i>Thermosulfidibacter</i>	<i>T. takai</i>	Anaérobie, chimolithotrophesulfo réductrice, hydrogène oxydante	Yonaguni Knoll IV, Southern Okinawa Troughv	70	(Nunoura et al., 2008a)
<i>Desulfurobacterales</i>	<i>Desulfurobacterium</i>	<i>D. thermolithotrophum</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice	Snake Pit, Atlantique (MAR)	70	(L'Haridon et al., 1998)
		<i>D. crinifex</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice et dénitrifiante	CASM, Pacifique (JdFR)	60-65	(Alain et al., 2003)
		<i>D. atlanticum</i>	anaérobie, chimolithoautotrophe stricte, réduit le soufre et les nitrates	23°N MAR	70-75	(L'Haridon et al., 2006b)
		<i>D. pacificum</i>	anaérobie, chimolithoautotrophe stricte, réduit le soufre, les thiosulfates et les nitrates	13°N EPR	75	(L'Haridon et al., 2006b)
		<i>Balnearium</i>	<i>B. lithotrophicum</i>	Anaérobie, autotrophe, hydrogeno-oxidante, Sulforéductrice	Suiyo seamount, Pacifique	70-75
	<i>Thermovibrio</i>	<i>T. ammonificans</i>	Anaérobie, autotrophe, Nitrate et sulforeducteur	EPR 9.50°N	75	(Vetriani et al., 2004)
<i>T. guaymasensis</i>		anaérobie, chimolithoautotrophe stricte, réduit le soufre et les nitrates	Guaymas basin	75-80	(L'Haridon et al., 2006b)	
<i>Thermotogales</i>	<i>Marinitoga</i>	<i>M. camini</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Ménez-Gwen, Atlantique (MAR)	55	(Wery et al., 2001a)
		<i>M. piezophila</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Grandbonum, Pacifique EPR 13°N	65	(Alain et al., 2002a)

		<i>M. okinawensis</i>	Hétérotrophe anaérobie stricte, réduit le soufre qui stimule la croissance	Southern Okinawa Trough	55-60	(Nunoura et al., 2007b)
	<i>Thermotoga</i>	<i>M. hydrogenitolerans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Rainbow MAR	60	(Postec et al., 2005c)
		<i>Thermotoga sp.</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Snake Pit, Atlantique (MAR)	80	(Marteinsson et al., 1997)
	<i>Thermosipho</i>	<i>T. melanesiensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Bassin de Lau, Pacifique	70	(Antoine et al., 1997)
		<i>T. japonicus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo- et thiosulfato-réductrice	Bassin de Iheya (Okinawa), Pacifique	72	(Takai and Horikoshi, 2000a)
		<i>T. atlanticus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire	Mid-Atlantic Ridge Menez Gwen	65	(Urios et al., 2004b)
<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>T. hydrogeniphilum</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfato-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	75	(Jeanthon et al., 2002)
	<i>Thermodesulfatator</i>	<i>T. indicus</i>	Anaérobie autotrophe, sulfatoreducteur	Central Indian Ridge	70	(Moussard et al., 2004)
	<i>Thermodesulfatator</i>	<i>T. atlanticus</i>	Anaérobie, sulfato-réducteur	Mid-Atlantic Ridge Rainbow	65-70	Alain 2008 submitted
<i>Nouvelle lignée</i>	<i>Caldithrix</i>	<i>C. abyssi</i>	Anaérobie, mixotrophe, fermentaire, dénitrification couplée à oxydation d'hydrogène ou d'acétate	Logatchev, Atlantique (MAR)	60	(Miroshnichenko et al., 2003a)
<i>Groupe des Thermus-Deinococcus</i>	<i>Thermus</i>	<i>T. thermophilus GY1211</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique	75	(Marteinsson, 1999)
		<i>Thermus sp.</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique et Snake Pit, Atlantique (MAR)	70-80	(Marteinsson et al., 1995)
	<i>Marinithermus</i>	<i>M. hydrothermalis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Suiyo Seamount, Pacifique	67	(Sako et al., 2003)
	<i>Oceanithermus</i>	<i>O. profundus</i>	Microaérophile, lithotrophe facultative oxydant l'hydrogène, organohétérotrophe,	Pacifique (EPR 13°N)	60	(Miroshnichenko et al., 2003c)
		<i>O. desulfurans</i>	Microaérophile, chimiohétérotrophe, réduit O ₂ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ et S ⁰	Suiyo Seamount, Pacifique	60	(Mori et al., 2004)
	<i>Vulcanithermus</i>	<i>V. mediatlanticus</i>	Microaérophile, lithohétérotrophe réduisant O ₂ et NO ₃ ⁻	Rainbow, Atlantique (MAR)	70	(Miroshnichenko et al., 2003d)

<i>Deferribacterales</i>	<i>Deferribacter</i>	<i>D. desulfuricans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, réduisant le soufre, les nitrates et l'arsenate	Suiyo Seamount, Pacifique	60-65	(Takai et al., 2003a)
		<i>D. abyssi</i>	Anaérobie, litho ou organo-autotrophe, réduisant S ⁰ , NO ₃ ⁻ et Fe ³⁺	Rainbow et Ménez-Gwen, Atlantique (MAR)	60	(Miroshnichenko et al., 2003b)
		<i>D. autotrophicus SL50</i>		Ashadze		Slobodkin non publié
<i>Firmicutes</i>	<i>Caloranaerobacter</i>	<i>C. azorensis</i>	Anaérobie, fermentaire	Lucky Strike, Atlantique (MAR)	65	(Wery et al., 2001b)
	<i>Gaminicella</i>	<i>C. sporogenes</i>	Anaérobie, fermentaire	Elsa, Pacifique (EPR 13 ^N)	55-60	(Alain et al., 2002d)
	<i>Clostridium</i>	<i>C. caminithermale</i>	Anaérobie, fermentaire, capable de réaliser la réaction de Stickland	Ménez-Gwen, Atlantique (MAR)	45	(Brisbarre et al., 2003)
		<i>C. tepidiprofundum</i>	Anaérobie, thermophile, fermentaire	EPR 13 ^N	50	(Slobodkina et al., 2008)
	<i>Tepidibacter</i>	<i>T. thalassicus</i>	Anaérobie, fermentaire, réduisant S ⁰	Pacifique (EPR 13 ^N)	50	(Slobodkin et al., 2003)
		<i>T. formicigenes</i>	Anaérobie fermentaire	Menez Gwen(MAR)	45	(Urios et al., 2004a)
	<i>Carboxydobrachium</i>	<i>C. pacificum</i>	Anaérobie, fermentaire. Capable de croissance par lithotrophie sur CO	Pacifique (Okinawa)	70	(Sokolova et al., 2001)
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassins de Guaymas et de Lau, Pacifique et Snake Pit, Atlantique (MAR)	60-80	(Marteinsson et al., 1996)
	<i>Exiguobacterium</i>	<i>E. profundum</i>	Fermentative produit ac lactique réduit les nitrates en nitrites en conditions anaérobies	Pacifique (EPR 13 ^N)	45	(Crapart et al., 2007)
	<i>Vulcanibacillus</i>	<i>V. modesticaldus</i>	Chimioorganohétérotrophe avec les sucres, protéines et acides organiques avec le nitrate comme accepteur d'électron.	Rainbow (MAR)	55	(L'Haridon et al., 2006a)
<i>Alpha Proteobacteria</i>	<i>Indéterminé</i>	<i>Souche JF-1</i>	Aérobie pratiquant la photosynthèse anoxygénique	Pacifique (JdFR)	30	(Yurkov and Beatty, 1998)
<i>Beta-Proteobacteria</i>	<i>Thiobacillus</i>	<i>T. hydrothermalis</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le tetrathionate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates	Bassin Nord Fidjien, Pacifique	35	(Durand et al., 1993)

<i>Delta-Proteobacteria</i>	<i>Geothermobacter</i>	<i>G. ehrlichii</i>	Anaérobie, réduisant le fer ferrique et les nitrates	Bag city, Pacifique (JdFR)	55	(Kashefi et al., 2003)
	<i>Desulfovibrio</i>	<i>D. hydrothermalis</i>	Anaérobie, mixotrophe, sulfato-, sulfito-, thiosulfato-réductrice	Grandbonum, Pacifique (EPR 13°N)	35	(Alazard et al., 2003)
	<i>Desulfonauticus</i>	<i>D. submarinus</i>	H ₂ /CO ₂ et formate comme donneur d'électron avec acetate comme source de carbone. Sulfate, sulfite, thiosulfate et soufre élémentaire comme accepteur terminal d'électron pendant l'oxydation de H ₂	Alvinella and Riftia 13°N East-Pacific Rise	45	(Audiffren et al., 2003)
	<i>Desulfothermus</i>	<i>D. okinawensis</i>	Thermophiles, hétérotrophes, réduit les sulfates	Yonaguni Knoll IV in the Southern Okinawa Trough	50	(Nunoura et al., 2007a)
<i>Gamma-Proteobacteria</i>	<i>Thiomicrospira</i>	<i>T. crunogena</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	Pacifique (EPR 21°N)	28-32	(Jannasch et al., 1985)
		<i>T. thermophila</i>	Microaérophile, sulfoxydante, chemolithomixotrophe	Mariana Arc, Ouest Pacifique	35-40	(Takai et al., 2004c)
		<i>Thiomicrospira sp., strain MA-3</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	TAG, Atlantique (MAR)	28-32	(Wirsen et al., 1998)
		<i>Thiomicrospira sp., strain L-12</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre, le sulfure d'hydrogène en sulfates	Galapagos, Pacifique	25	(Ruby and Jannasch, 1982)
	<i>Amphritea</i>	<i>Amphritea atlantica</i>	Aérobie, dégradation de la matière organique	Logatchev hydrothermal vent field	31	(Gartner et al., 2008)
	<i>Vibrio</i>	<i>V. diabolicus</i>	Anaérobie facultatif, hétérotrophe	Pacifique (EPR 13°N)	30-45	(Raguénès et al., 1997)
	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii subsp. fijiensis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin Nord Fidjien, Pacifique	25-35	(Raguénès et al., 1996)
		<i>A. infernus</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique	25-35	(Raguénès et al., 1997)
		<i>A. macleodii subsp. fijiensis biovar medioatlantica</i>	Aérobie, hétérotrophe	Snake Pit, Atlantique (MAR)	35-40	(Raguénès et al., 2003)
	<i>Halomonas</i>	<i>H. neptunia</i>	Aérobie, hétérotrophe	Pacifique	2	(Kaye et al., 2004)

		<i>H. sulfidaeris</i>	Aérobic, hétérotrophe	Juan de Fuca, Pacifique	20	(Kaye et al., 2004)
		<i>H. axialensis</i>	Aérobic, hétérotrophe	Juan de Fuca, Pacifique	20	(Kaye et al., 2004)
		<i>H. hydrothermalis</i>	Aérobic, hétérotrophe	South pacific Ocean, Pacifique	20	(Kaye et al., 2004)
<i>Epsilon-Proteobacteria</i>	<i>Caminibacter</i>	<i>C. hydrogeniphilus</i>	Anaérobic, autotrophe, sulfo-réductrice, dénitrifiante	Elsa, Pacifique (EPR 13N)	60	(Alain et al., 2002b)
		<i>C. profundus</i>	Microaérophile, anaérobic autotrophe sulforéductrice, dénitrifiante	Rainbow (MAR)	55	(Miroshnichenko et al., 2004)
		<i>C. mediatlanticus</i>	Anaérobic, autotrophe, sulfo-réductrice, dénitrifiante	Rainbow (MAR)	55	(Voordeckers et al., 2005)
	<i>Nautilia</i>	<i>N. lithotrophica</i>	Anaérobic, autotrophe, sulfo-réductrice	Pacifique (EPR 13N)	53	(Miroshnichenko et al., 2002)
		<i>N. profundicola</i>	Anaérobic, autotrophe, sulfo-réductrice	Pacifique (EPR 13N)	40	(Smith et al., 2008)
		<i>N. abyssi</i>	Anaérobic, sulfo réductrice, autotrophe	Pacifique (EPR 13N)	60	Alain 2008 sous presse
	<i>Sulfurospirillum</i>	<i>Sulfurospirillum sp. Am-N</i>	Anaérobic, hétérotrophe	Pacifique (EPR 13N)	41	(Campbell et al., 2001)
	<i>Sulfurimonas</i>	<i>S. autotrophica</i>	Autotrophe soufre oxydante	Mid-Okinawa Trough Pacifique	25	(Inagaki et al., 2003)
		<i>S. paralvinella</i>	Anaérobic facultative croissance avec H ₂ , S ⁰ ou thiosulfate comme seule source d'énergie et CO ₂ comme source de carbone	Mid-Okinawa Trough	30	(Takai et al., 2006)
	<i>Hydrogenimonas</i>	<i>H. thermophila</i>	Microaérophile anaérobien autotrophesulforéductrice, dénitrifiante	Central Indian ridge	55	(Takai et al., 2004a)
	<i>Sulfurovum</i>	<i>S. lithotrophicum</i>	Microaérophile anaérobic autotrophe, soufre et thiosulfate oxydante	Okinawa Trough, Japon	28-30	(Inagaki et al., 2004)
	<i>Thioreductor</i>	<i>T. micantisoli</i>	Autotrophe anaérobic sulforéductrice, dénitrifiante	Okinawa Trough, Japon	32	(Nakagawa et al., 2005)
	<i>Lebetimonas</i>	<i>L. acidiphila</i>	Autotrophe anaérobic sulforéductrice	Mariana Arc, Pacifique	50	(Takai et al., 2005)

Tableau 3 : *Archaea* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes (modifié d'après Alain, Postec, Godfroy)

	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° opt (°C)	Référence
<i>Nanoarchaeota</i>	<i>Nanoarchaeum</i>	<i>N. equitans</i>	Enrichie en conditions d'anaérobiose et d'autotrophie	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	90	(Huber et al., 2002a)
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Desulfurococcus sp S et SY</i>	Anaérobie, hétérotrophe, sulforéducteur	EPR 11°N	85 et 90	(Jannasch et al., 1988)
	<i>Ignicoccus</i>	<i>I. pacificus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réducteur	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	90	(Huber et al., 2000)
	<i>Staphylothermus</i>	<i>S. marinus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, sulfo-réducteur	Pacifique (EPR 11°N)	85-92°C	(Fiala and Stetter, 1986)
	<i>Pyrodictium</i>	<i>P. abyssi</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	97	(Pley et al., 1991)
		<i>Souche 121</i>	Réalise l'oxydation du formate couplée à la réduction du fer ferrique (formation magnétite)	Mothra (Finn), Pacifique (JdFR)	Gamme T°: 85-121°C	(Kashefi and Lovley, 2003)
	<i>Pyrolobus</i>	<i>P. fumarii</i>	Anaérobie facultatif, autotrophe oxydant l'hydrogène et réduisant les nitrates, le thiosulfate et les faibles concentrations d'oxygène	TAG, Atlantique (MAR)	106	(Blöchl et al., 1997)
	<i>Aeropyrum</i>	<i>A. camini</i>	Hétérotrophe aérobie	Suyio Seamount, Izu Bonin Arc, Pacifique	85	(Nakagawa et al., 2004a)
<i>Euryarchaeota</i>						
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>M. jannaschii</i>	Anaérobie, méthanogène	Pacifique (EPR 21°N)	85	(Jones et al., 1983)
		<i>M. Jannaschii str FS406-22</i>	Anaérobie, méthanogène Fixatrice d'azote	Pacifique Axial volcano Juan de Fuca	90	(Mehta and Baross, 2006)
		<i>M. infernus</i>	Anaérobie, méthanogène	Logatchev, Atlantique (MAR)	85	(Jeanthon et al., 1998)
		<i>M. vulcanius</i>	Anaérobie, méthanogène	Pacifique (EPR 13°N)	80	(Jeanthon et al., 1999)
		<i>M. indicus</i>	Anaérobie, méthanogène	Central indian Ridge	85	(L'Haridon et al., 2003)
	<i>Methanothermococcus</i>	<i>M. okinawensis</i>	Anaérobie, méthanogène	Iheya Ridge, Pacifique (Okinawa)	60-65	(Takai et al., 2002)

	<i>Methanotorris</i>	<i>M. formicicus</i>	Anaérobie, méthanogène	Central indian Ridge	75	(Takai et al., 2004b)
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyrus</i>	<i>M. kandleri</i>	Anaérobie, méthanogène, sulfo-réducteur réduisant le CO ₂ ou le CH ₄	Bassin de Guaymas, Pacifique	98	(Burggraf et al., 1991; Kurr et al., 1991)
<i>Thermococcales</i>	<i>Thermococcus</i>	<i>T. guaymensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Canganella and Jones, 1994; Canganella et al., 1997; Canganella et al., 1998)
		<i>T. aggregans</i>		Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Canganella et al., 1998)
		<i>T. barossi</i>		Pacifique (JdFR)	82	(Duffaud et al., 1998)
		<i>T. fumicolans</i>		Bassin Nord Fidjien (Pacifique)	85	(Godfroy et al., 1999)
		<i>T. hydrothermalis</i>		Pacifique (EPR 21N)	85	(Godfroy et al., 1997)
		<i>T. peptonophilus</i>		Pacifique	85-90	(Gonzalez et al., 1995)
		<i>T. siculi</i>		Pacifique (Okinawa)	85	(Grote et al., 1999)
		<i>T. chitonophagus</i>		Bassin de Guaymas, Pacifique	85	(Huber et al., 1995b)
		<i>T. barophilus</i>		Snake Pit, Atlantique (MAR)	85	(Marteinsson et al., 1999)
		<i>T. atlanticus</i>		TAG, Atlantique (MAR)	85	(Cambon-Bonavita et al., 2003)
		<i>T. gammatolerans</i>		Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Jolivet et al., 2003)
		<i>T. marinus</i>		Snake Pit MAR	88	(Jolivet et al., 2004)
		<i>T. radiotolerans</i>		Bassin de Guyamas, Pacifique	88	(Jolivet et al., 2004)
		<i>T. coalescens</i>		Suiyo Seamount	87	(Kuwabara et al., 2005)
		<i>T. celericrescens</i>		Suiyo Seamount,	80	(Kuwabara et al., 2007)
		<i>T. thioeducens</i>		Rainbow (MAR)	83-85	(Pikuta et al., 2007)
		<i>Thermococcus sp</i> <i>ES1</i>		Juan de Fuca, Pacifique	82	(Pledger and Baross, 1989)

	<i>Thermococcus sp</i> DT-1331		Minami-ensei Knoll, Mid-Okinawa		(Kwak et al., 1995)
	<i>Thermococcus sp</i>		EPR 11, 13 et 21N		(Raguénès et al., 1995)
	<i>Thermococcus sp</i>		Bassin de Guyamas EPR		(Antoine et al., 1995)
	<i>Thermococcus sp</i>		Bassin de Guyamas EPR		(Lepage et al., 2004)
	<i>Thermococcus sp.</i>	CO oxydation avec H2			(Sokolova et al., 2004)
	<i>Thermococcus sp</i>		Juan de Fuca Ridge, Pacifique		(Holden et al., 2001)
Pyrococcus	<i>P. abyssi</i>		Bassin Nord-Fidjien, Pacifique	96	(Erauso et al., 1993)
	<i>P. glycovorans</i>		Pacifique (EPR 13N)	95	(Barbier et al., 1999)
	<i>P. horikoshii</i>		Pacifique (Okinawa)	98	(Gonzalez et al., 1998)
	<i>Pyrococcus sp</i> GBD		Bassin de Guyamas Pacifique	95	(Jannasch et al., 1992)
	<i>Pyrococcus sp</i> ES4		Juan de Fuca , Pacifique	90-99	(Pledger and Baross, 1991)
	<i>Pyrococcus sp</i>		13N EPR		(Lepage et al., 2004)
Palaeococcus	<i>P. ferrophilus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, réduisant le soufre (fer nécessaire comme cofacteur pour sa croissance)	Pacifique (Ogasawara)	83	(Takai et al., 2000)
Archaeoglobales	Archaeoglobus	<i>A. profundus</i>	Anaérobie, mixotrophe, sulfato-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	82 (Burggraf et al., 1990)
		<i>A. veneficus</i>	Anaérobie, croissance en lithoautotrophie avec les sulfites ou le thiosulfate comme accepteurs ou respiration organotrophe des sulfites	Snake Pit, Atlantique (MAR)	75-80 (Huber et al., 1997)
	Geoglobus	<i>G. ahangari</i>	Anaérobie, mixotrophe, croissance en lithoautotrophie ou en organohétérotrophie avec le fer ferrique comme accepteur d'électrons	Bassin de Guaymas, Pacifique	88 (Kashefi et al., 2002)
	Geoglobus	<i>G. abyssalis</i>		EPR	Slobodkin non publié
DHVE2	'Aciduliprofundum	<i>A. Boonei</i>	Heterotrophe anérobie réducteur soufre et fer thermoacidophile	Mariner vent field Bassin de Lau	70 (Reysenbach et al., 2006)

4. Fonctionnement des principaux cycles biogéochimiques : Généralités et cas du pôle chaud de l'écosystème hydrothermal

Parmi les principaux cycles biogéochimiques présents au niveau de l'écosystème hydrothermal on retrouve principalement les cycles du Fer, de l'Azote, du Carbone et du Soufre. Pour chaque cycle, après une présentation générale de leur fonctionnement notamment dans le milieu marin, un état des lieux des connaissances de leur fonctionnement dans l'écosystème hydrothermal et principalement à haute température sera réalisé.

4.1. Le cycle du Fer

Le fer (Fe) est un élément chimique nécessaire à la vie. Chez les procaryotes, il joue un rôle clé dans les métabolismes aérobies et anaérobies, c'est un composant essentiel des cytochromes, protéines fer-soufre [ferredoxines], et de certaines enzymes telles que les catalases, peroxydases, oxygénases. Pour de nombreux micro-organismes se développant dans les eaux, les sols et les sédiments, son rôle se prolonge bien au-delà. Le fer ferreux (Fe II) est utilisé comme donneur d'électrons par les micro-organismes ferro-oxydants aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies. Le fer ferrique (Fe III) est utilisé comme accepteur terminal d'électrons dans des conditions d'anoxie par les micro-organismes ferro-réducteurs.

A pH neutre ou basique le fer existe principalement en tant que minéral insoluble et sous forme de fer ferreux Fe (II) ou fer ferrique Fe (III). La solubilité du Fe (III) augmente avec une diminution de pH (Cornel and Schwertmann, 2003). Des valeurs de pH décroissantes augmentent également la stabilité du Fe (II), et au-dessous de pH 4.0, le Fe (II) existe principalement sous forme dissoute (Stumm and Morgan, 1996). Deux réactions principales composent le cycle du fer, l'oxydation du fer ferreux Fe^{2+} et la réduction du fer ferrique Fe^{3+} (Figure 13).

4.1.1. Oxydation du fer ferreux Fe (II) :

Le rôle des micro-organismes dans l'oxydation du Fe (II) dans les environnements acides est bien établi. La transition entre le fer ferreux Fe (II) et le fer ferrique Fe (III) a un rôle fondamental dans la chimie de l'environnement et était probablement un processus biogéochimique important sur la Terre primitive. Avant que ces réactions rédox ne soient mises en évidence, on a longtemps pensé que les mécanismes abiotiques dominaient la chimie du fer.

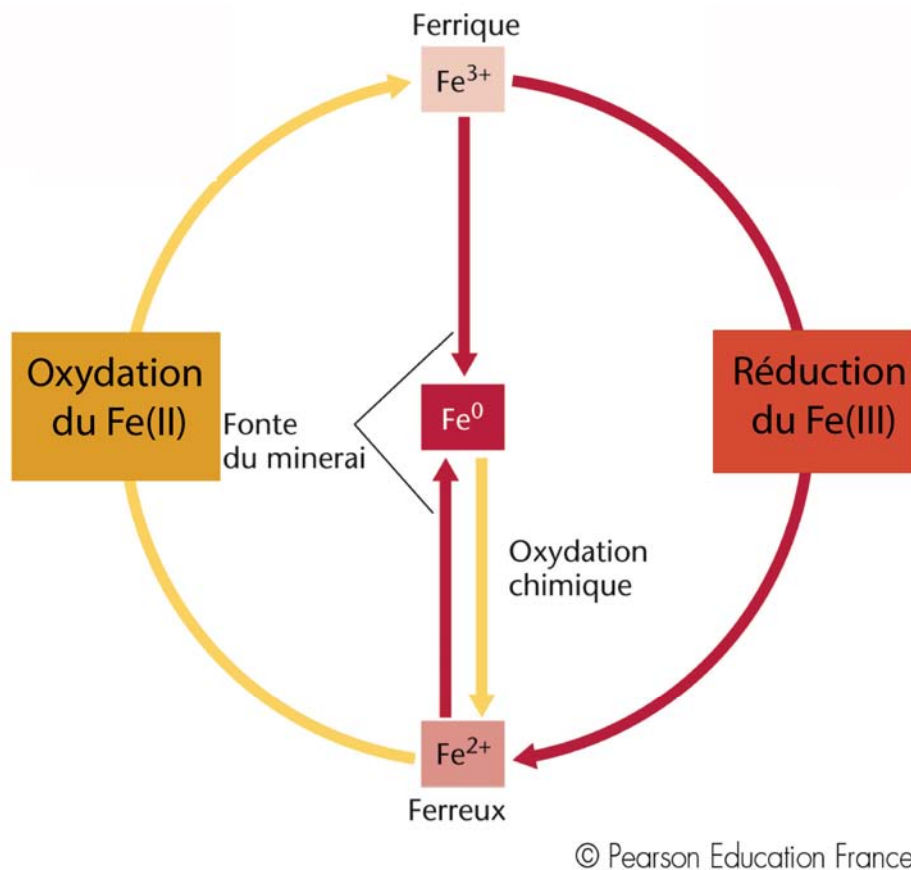


Figure 13: Principales réactions du cycle du Fer d'après « Brock Biologie des micro-organismes » Chapitre 19 (Madigan and Martinko, 2007)

De plus le seul accepteur d'électrons capable d'oxyder spontanément Fe²⁺ est O₂. L'oxydation biologique la plus importante du fer ferreux s'effectue à pH acide car dans ces conditions il est stable et non oxydé spontanément. Dans les habitats très acides, le chimiolithotrophe *Acidithiobacillus ferroxidans* oxyde Fe²⁺ en Fe³⁺. Cependant cette réaction est très lente et n'est pas énergétiquement rentable car très peu d'énergie est générée et ces bactéries doivent donc oxyder beaucoup de fer pour leur croissance.

En milieu hydrothermal, Hafenbradl *et coll.* ont isolé la première *Archaea* hyperthermophile ferro-oxydante *Ferroglobus placidus* d'une source hydrothermale cotière en Italie (Hafenbradl *et al.*, 1996). Elle est capable d'oxyder le fer ferreux en condition anaérobie à pH neutre et à 85°C. *Paleococcus ferrophilus* quant à elle requiert du fer ferreux Fe²⁺ et du soufre élémentaire S⁰ pour sa croissance mais n'utilise pas le fer ferreux comme accepteur ou donneur d'électrons (Takai *et al.*, 2000).

4.1.2. Réduction du fer ferrique Fe (III)

Le potentiel redox du Fer III est situé entre celui de l'oxygène O₂ et celui du nitrate NO₃⁻ (Lovley and Phillips, 1986). Par conséquent l'utilisation de cet accepteur d'électrons est énergétiquement favorable dans les habitats dépourvus d'oxygène. De nombreux micro-organismes peuvent utiliser l'ion ferrique comme accepteur terminal d'électrons. Il s'agit essentiellement de micro-organismes chimioorganotrophes et chimiolithotrophes. L'insolubilité naturelle du Fer (III) à pH 4 crée un dilemme métabolique pour les micro-organismes utilisant le Fer (III) comme accepteur terminal d'électrons. De nombreux micro-organismes, aussi bien au sein des *Archaea* que des *Bacteria*, seraient capables de croître en utilisant le Fer (III) et ce dans des conditions physico chimiques variées, montrant ainsi l'ubiquité de ce métabolisme. Parmi les micro-organismes isolés d'écosystèmes marins et formellement décrits, on retrouve des *Archaea* et des *Bacteria* thermophiles, psychrophiles, acidophiles et alcalinophiles (Lovley et al., 2004).

Dans les environnements anaérobies chauds, les micro-organismes hyperthermophiles peuvent oxyder l'hydrogène et métaboliser les acides organiques à longue chaîne et les composés aromatiques en employant le Fe (III) comme accepteur d'électrons (Kashefi et al., 2008). De nombreux hyperthermophiles disponibles en culture pure peuvent réduire le Fe (III), suggérant que cette capacité de réduction du Fe (III) est une caractéristique fortement conservée chez les micro-organismes hyperthermophiles (Kashefi et al., 2002; Kashefi et al., 2003).

Plus précisément, au sein des *Archaea* hyperthermophiles, au sein de l'ordre des *Archaeoglobales*, l'espèce du genre *Geoglobus ahangari* isolée d'une cheminée hydrothermale du bassin de Guaymas oxyde le dihydrogène, le pyruvate, les peptides et de nombreux autres éléments, et réduit le Fer (III) en condition anaérobie (Kashefi et al., 2002). Dans les édifices hydrothermaux actifs, la présence de Fe(III) est vraisemblablement due à l'oxydation du Fe (II) par l'eau de mer froide et oxygénée ou à la réduction couplée des sulfates de l'eau de mer au Fe (II) à haute température (Jannasch and Mottl, 1985).

Bien que les micro-organismes impliqués dans ces métabolismes soient omniprésents, la réduction du Fe (III) et l'oxydation du Fe (II) demeurent une énigme, car aucune ferro-réductase n'a pu être identifiée (Weber et al., 2006).

La présence de micro-organismes capables de réduire du Fe(III) dans les édifices hydrothermaux actifs a été montrée (Slobodkin et al., 2001). La capacité des *Thermococcales*

et des *Thermotogales* à réduire le Fe (III) a été mise en évidence chez plusieurs espèces de ces groupes (Vargas et al., 1998; Slobodkin et al., 2001). La capacité à réduire le Fe (III) a également été démontrée chez les organismes du genre *Deferribacter* (Greene et al., 1997 ; Miroshnichenko et al., 2003b; Takai et al., 2003a). Une souche dont la croissance serait encore possible à 121°C utilise le Fer (III) comme accepteur d'électrons (Kashefi and Lovley, 2003).

Si la réduction du Fer (III) a été mise en évidence dans les édifices hydrothermaux notamment par l'isolement d'espèces telles que *Geoglobus* et *Geothermobacter* aucun micro-organisme oxydant le Fer (II) n'a été détecté. L'oxydation du fer a probablement lieu à plus basse température dans les zones oxygénées de l'écosystème. Certaines espèces ferro-oxydantes sont également capables d'oxyder le fer en anaérobiose en utilisant le nitrate comme accepteur terminal d'électrons (Edwards et al., 2003). Des études récentes ont mis en évidence que des micro-organismes ferro-oxydants étaient associés à la crevette *Rimicaris exoculata*, induisant la formation de dépôt d'oxyhydroxyde de fer conséquent dans la cavité branchiale de l'animal (Corbari et al., 2008) (Schmidt et al., soumis).

4.2. Le cycle de l'Azote

Cette partie est développée de façon plus précise dans cette revue bibliographique afin d'introduire la partie 1 de cette thèse sur le métabolisme anammox.

L'azote, constituant important des acides nucléiques, des acides aminés, de la porphyrine et de nombreux sucres, est un composé clé de nombreux cycles biogéochimiques (Falkowski et al., 1998). Il partage également avec de nombreux autres éléments un rôle important dans les phénomènes de réduction et d'oxydation en milieu marin (Hulth et al., 1999). Il est fortement affecté par les activités anthropiques. Dans l'environnement marin, l'azote est présent principalement sous 5 formes :

- **Le diazote N_2** qui est la forme la plus stable.
- **Les nitrates NO_3^-** qui sont la forme la plus oxydée de l'azote, la forme dominante et la plus assimilable dans les environnements oxygénés.
- **L'ammonium NH_4^+** qui est la forme la plus réduite de l'azote, mais aussi la forme dominante assimilable dans les environnements anoxiques.
- **L'azote organique sous forme particulaire** est prédominant au niveau des sédiments et souvent associé à de l'azote inorganique (Brandes et al., 2007).
- **Les nitrites**

Nitrate, nitrite, ammonium et azote organique sont regroupés sous le terme « azote fixé » bien que chaque forme ait un degré différent de réactivité. Ces différents composés sont liés par un ensemble de réactions.

4.2.1. Principales réactions du cycle de l'azote

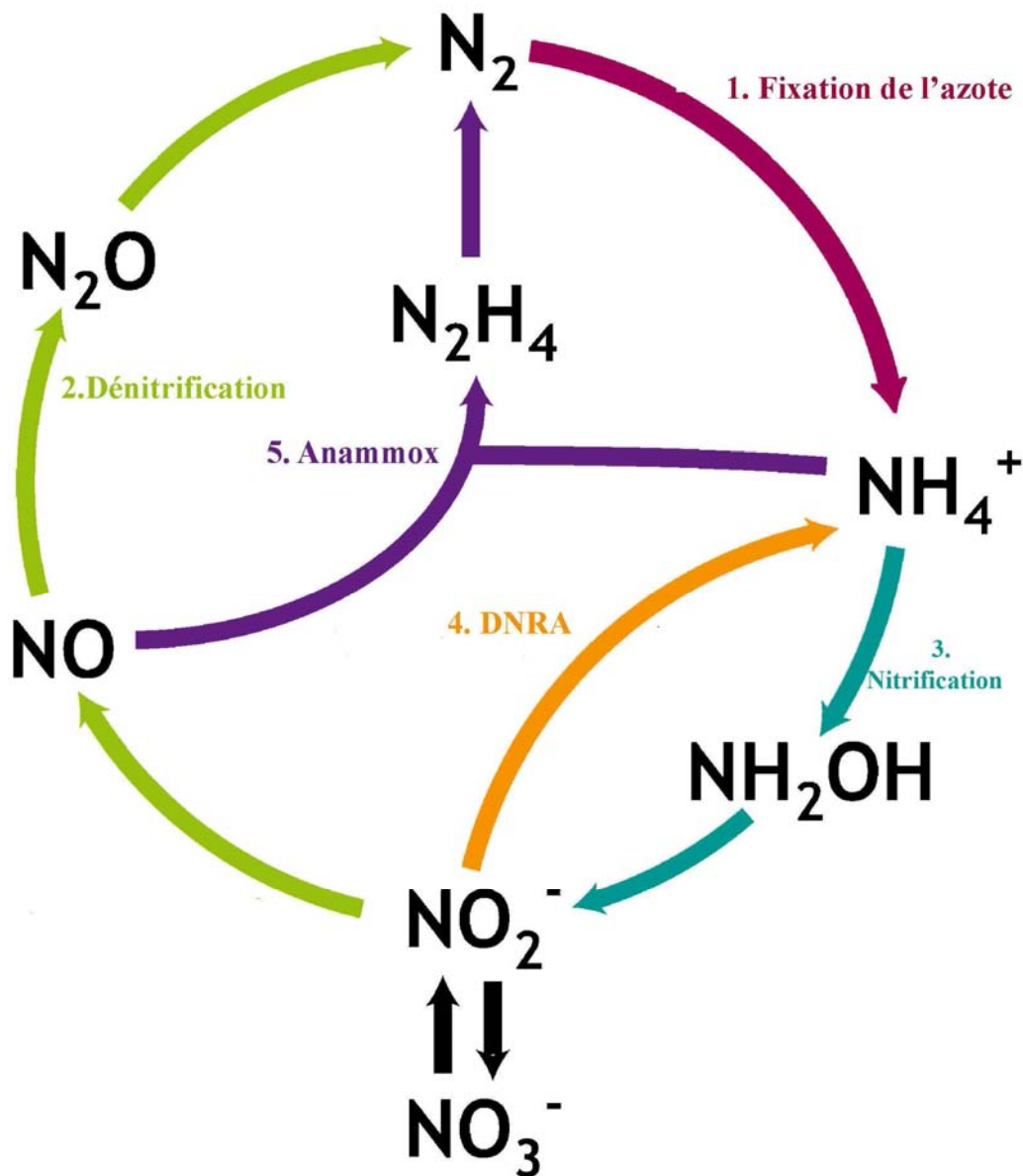


Figure 14: Diagramme du cycle de l'azote d'après Jetten (Jetten, 2008).

- La Fixation de l'azote. (1) sur la Figure 14

Certains organismes sont capables d'utiliser N₂ comme source d'azote. Cette capacité leur confère un avantage écologique significatif. Des micro-organismes fixateurs d'azote sont

libres (*Azotobacter*, *Rhodobacter*, les Cyanobactéries), d'autres forment des associations symbiotiques avec des plantes (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*).

- La Dénitrification (Shapleigh, 2006). (2) sur la Figure 14

C'est une respiration anaérobie où les nitrates NO_3^- sont réduits en NO_2^- , NO , N_2O , et N_2 . L'azote disponible biologiquement, généré dans les environnements marins ou terrestres, est fixé par les bactéries fixatrices d'azote. Cet azote fixé se trouve alors parmi le pool d'azote disponible pour la nitrification de l'ammonium en nitrates par les bactéries. Lorsque les formes intermédiaires, telles que le nitrite et le N_2O sont présentes, elles sont considérées comme des indicateurs de l'activité du cycle de l'azote (Codispoti et al., 1986; Ward, 2000).

La dénitrification est considérée comme un processus par lequel le nitrate est utilisé comme accepteur terminal d'électrons dans l'oxydation de la matière organique une fois que l'oxygène dissous était utilisé. Cette réaction est conduite par des organismes anaérobies facultatifs (Codispoti and Christensen, 1985; Devol, 2003). La dénitrification, seule voie du cycle connue pour engendrer des pertes d'azote, est confinée au niveau des sédiments et de la colonne d'eau.

- La nitrification (3) sur la Figure 14

La nitrification correspond à l'oxydation de NH_3 en NO_3^- . Elle est réalisée par l'activité des bactéries nitrifiantes. Ces bactéries sont largement distribuées dans les sols et les eaux. Par exemple, un groupe de bactéries les nitrosantes du genre *Nitrosomonas* par exemple (Hunik et al., 1993) oxyde l'ammoniac en nitrites et un autre groupe les nitratantes avec notamment les espèces du genre *Nitrobacter* (Grundmann and Normand, 2000) oxyde les nitrites en nitrates.

- DNRA (Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium) (Shapleigh, 2006) (4) sur la Figure 14

Ce processus correspond à la réduction des nitrates en ammonium en milieu naturel (Francis et al., 2007). Celui-ci a pris de l'importance ces dernières années en tant que réaction majeure dans les environnements marins et terrestres. Elle a été mise en évidence dans des sédiments anoxiques et des sédiments contenant des sulfures (An et al., 2001). Les organismes les plus connus utilisant les nitrates appartiennent aux genres *Thioplaca* et *Thiomargarita*, retrouvés

dans les sédiments à la base de la zone suboxique et dénitrifiante de la colonne d'eau de la Mer d'Arabie, du Pacifique Est Tropical et de la Namibie (Thamdrup and Dalsgaard, 2002). Ces organismes peuvent coupler la réduction des nitrates en ammonium avec l'oxydation des composés soufrés réduits. Les genres *Thioplaca* et *Thiomargarita* sont tous deux capables de concentrer les nitrates jusqu'à 0,5M dans de larges vacuoles pour une oxydation ultérieure des sulfures (McHatton et al., 1996). Le devenir de l'ammonium produit par DNRA n'est pas encore bien compris. Dans l'environnement lorsque des taux élevés de sulfures (sulfure d'hydrogène, etc) inhibent la nitrification et la dénitrification conventionnelle, le processus DNRA permet de faire un cycle de l'azote plus court, préservant l'azote fixé dans ces environnements et permettant de meilleurs taux de productivité (An et al., 2001).

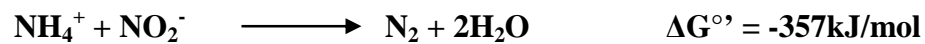
4.2.2. Anammox (5) sur la Figure 14

La dénitrification est accompagnée d'une libération d'ammonium à partir de l'utilisation de la matière organique. Il a été noté par Richards en 1965 que l'accumulation de l'ammonium n'avait pas lieu. Ces observations ont permis de proposer une réaction de Van Slyke et la possibilité d'une oxydation anaérobie de l'ammonium (Richards, 1965). Il a été suggéré en tenant compte de la distribution de l'ammonium et des nitrates que l'oxydation anaérobie de l'ammonium avait lieu en environnement peu oxygéné. Un exemple de ce type de distribution est le bassin anoxique de la Mer Noire, où l'oxygène est épuisé à partir d'une profondeur de 60m et le nitrate présent jusqu'à 80m, l'ammonium qui diffuse est également totalement utilisé. Ces profils suggèrent une diffusion à la fois des nitrates et de l'ammonium dans une zone de réaction commune où ils sont utilisés tous les deux. A partir de cette évidence en faveur de l'oxydation anaérobie de l'ammonium en N₂, Broda supposa qu'un organisme pouvant réaliser cette réaction « manquait dans la nature » (Broda, 1977).

Ce n'est qu'à partir de 1995 que la réaction anammox a été mise en évidence dans un bioréacteur par l'observation de la disparition du nitrite et de l'ammonium avec apparition de N₂ (Mulder et al., 1995). Quatre années plus tard, la découverte de micro-organismes capables de réaliser la réaction anammox dans un système similaire de bioréacteur (Strous et al., 1999b) a conduit à la description des espèces « *Candidatus* *Kuenenia stuttgartiensis* » et « *Candidatus* *Brocadia annamoxidans* ». La présence en milieu marin du processus anammox fut mise en évidence pour la première fois grâce à des mesures d'activité par utilisation d'isotopes stables (Thamdrup and Dalsgaard, 2002). La première bactérie anammox marine, « *Candidatus* *Scalindua sorokinii* », provenant de la Mer Noire, a été détectée par analyse du

gène codant pour l'ARNr16S. Des bactéries similaires ont été isolées à partir de sédiments estuariens au Danemark (Rysgaard and Nøhr Glud, 2004). Les bactéries anammox décrites sont considérées des micro-organismes chimioautotrophes, anaérobies stricts, fixant le CO₂ et utilisant les nitrites comme donneur d'électrons. Même de faibles concentrations en oxygène (à partir de 1,1 μM) inhibent la réaction anammox (Strous et al., 1999a).

Reaction anammox:



4.2.2.1. Les Planctomycètes : phylogénie et compartimentation cellulaire

Les Planctomycètes constituent un phylum divergent au sein du domaine des Bacteria. Ce phylum est important pour la compréhension de l'évolution bactérienne et l'organisation cellulaire des eucaryotes. La structure des cellules est différente de celle de la plupart des procaryotes. L'ADN est entouré par une membrane intra-cytoplasmique.

Les Planctomycètes comportent 10 genres dont 6 possèdent des représentants en culture pure (*Pirellula*, *Rhodopirellula*, *Blastopirellula*, *Planctomyces*, *Gemmata* et *Isosphaera*) et 4 ne possèdent pas à ce jour de représentant isolé *Candidatus* « Kuenenia», *Candidatus* « Scalindua», *Candidatus* « Anammoxoglobus» et *Candidatus* « Brocadia» (Fuerst, 2005).

Les analyses phylogénétiques effectuées à partir de séquences d'ARNr16S ont confirmé que les Planctomycètes formaient bien un groupe monophylétique distinct au sein des *Bacteria*. Ceci a contribué à l'élévation de ce groupe au rang de phylum au même titre que les Proteobacteries ou les Cyanobactéries (Woese, 1994). Une des plus récentes études montrerait que les Planctomycètes sont en effet un phylum avec un « embranchement profond », peut être plus ancien que les hyperthermophiles *Aquificales* (Brochier and Philippe, 2002), mais ces données sont controversées.

Toutes les Planctomycètes possèdent une organisation cellulaire similaire (Lindsay et al., 2001), mais il existe quelques différences au sein du phylum.

La compartimentation se fait par le biais de membranes internes. Le compartiment majeur contenant le nucléoïde est appelé pirellulosome bien distinct chez les espèces *Pirellula* et *Blastopirellula* (Lindsay et al., 2001). Chez d'autres espèces comme par exemple *Gemmata obscuriglobus*, le nucléoïde est également entouré d'une membrane formant un autre

compartiment cellulaire, le «corps nucléique», analogue du noyau chez les eucaryotes (Lindsay et al., 2001; Fuerst, 2005). La compartimentation la plus simple est retrouvée au sein des genres *Pirellula*, *Blastopirellula*, *Rhodopirellula* et *Isosphaera* chez qui une seule membrane sépare le cytoplasme en deux compartiments : le pirellulosome et le paryphoplasme (Fuerst, 2005). Les genres *Kuenenia*, *Scalindua* et *Brocadia* par exemple possèdent un anammoxosome (Figure 15).

4.2.2.2. Les Planctomycètes anammox

Des études sur différentes stations de traitement des eaux usées ont été effectuées à l'aide de techniques de biologie moléculaire et plus particulièrement en amplifiant le gène codant pour l'ARNr16S avec des oligonucléotides spécifiques. Elles ont permis de mettre en évidence la présence d'au moins deux genres de bactéries anammox : *Candidatus* « *Kuenenia stuttgartiensis* », *Candidatus* « *Scalindua wagneri* » et *Candidatus* « *Scalindua brodae* » (Figure 16). Les genres proches de *Candidatus* « *Scalindua* spp » contribueraient de façon significative aux pertes d'azote dans les environnements marins (Kuypers et al., 2003; Kuypers et al., 2005; Francis et al., 2007; Schmid et al., 2007).

Candidatus « *Anammoxoglobus propionicus* », *Candidatus* « *Brocadia fulgida* » des bactéries anammox pouvant co-oxyder les acides organiques ont été enrichies à partir de boues issues de stations de traitement des eaux résiduaires en utilisant un milieu de culture contenant de l'ammonium, du nitrite, du propionate (*Candidatus* « *Anammoxoglobus propionicus* ») ou de l'acétate (*Candidatus* « *Brocadia fulgida* ») (Kartal et al., 2007b; Kartal et al., 2008).

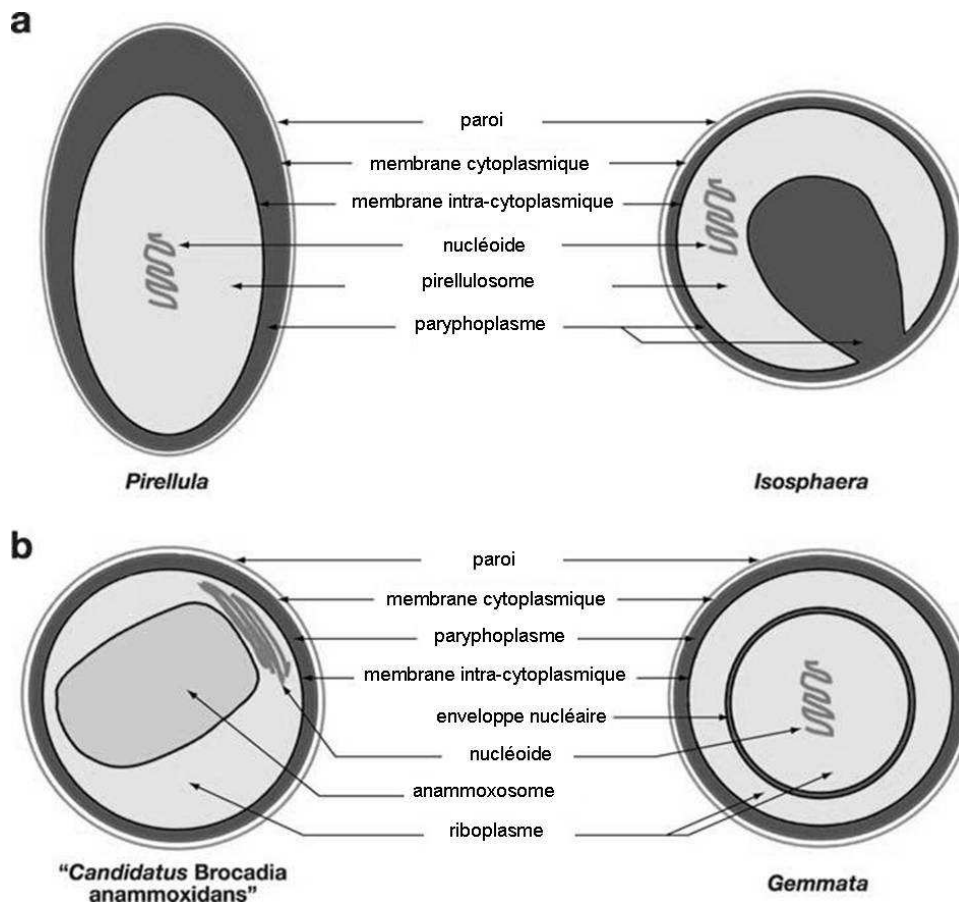


Figure 15: Compartimentation cellulaire chez les Planctomycètes : (a) *Pirellula* (e.g., *Pirellula staley*), *Isosphaera* (e.g., *Isosphaera pallida*) et (b) "Candidatus Brocadia anammoxidans, *Gemmata* (e.g., *G. obscuriglobus*). Sur ces schémas sont montrés la variabilité de la compartimentation cellulaire chez les Planctomycètes ainsi que les similitudes au niveau de leur organisation interne.

Trois des quatre genres anammox décrits ont été enrichis à partir d'un échantillon de boue (Strous et al., 2006; Kartal et al., 2007a). Le genre *Candidatus* « Scalindua » est jusqu'à présent le seul genre de bactéries anammox détecté dans un environnement naturel (Penton et al., 2006; Schubert et al., 2006; Schmid et al., 2007).

Les bactéries anammox comportent une organelle à simple membrane appelée « anammoxosome », siège de la réaction anammox. La membrane est formée majoritairement de laddéranes, lipides constitués de 3 à 5 cycles butanes concaténés (Sinninghe Damste et al., 2002). L'anammoxosome représente une part importante du volume cellulaire (Lindsay et al., 2001).

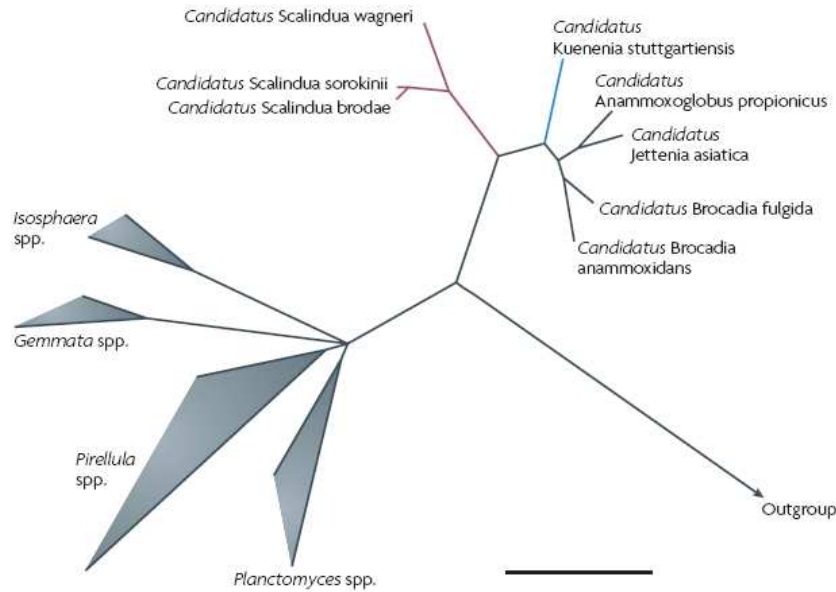


Figure 16: Arbre phylogénétique mettant en évidence les relations entre les espèces de bactéries anammox connues (Kuenen, 2008)

Les bactéries anammox ont une croissance lente, le temps de doublement varie de 11 à 20 jours à 43°C, cependant elles sont très bien adaptées à la transformation de leurs substrats. Elles sont inhibées de façon réversible par des faibles taux d'oxygène (<1µM) et de façon quasi-irréversible par des concentrations fortes en nitrites (>10mM).

La première hypothèse de voie métabolique pour le processus anammox fut basée sur des expériences d'utilisation d'azote 15 (¹⁵N). Un modèle définissant l'hydrazine et l'hydroxylamine comme intermédiaires de la réaction anammox a été proposé (van de Graaf et al., 1995).

Durant les dix dernières années de recherche sur les bactéries anammox, trois types d'approches ont été utilisées pour leur recherche et leur détection dans les stations de traitement des eaux usées et dans l'environnement (Kuypers et al., 2003; Rysgaard and Nøhr Glud, 2004; Rysgaard et al., 2004; Jetten et al., 2005; Kuypers et al., 2005; Kartal et al., 2007a) :

- les techniques moléculaires
- la détection des lipides
- les mesures d'activité par l'utilisation des isotopes de l'azote

4.2.2.3. Les méthodes d'étude

- Les techniques moléculaires :

Les techniques moléculaires basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et d'hybridation *in situ* ont été les méthodes utilisées pour la détection et la quantification des bactéries anammox.

La détection de ces bactéries dépend fortement du choix des amorces de PCR utilisées. Les bactéries anammox sont sous-représentées dans les banques de clones du gène codant pour l'ARNr16S construites après amplification avec des amorces universelles *Bacteria*. Lorsque les amorces Planctomycètes ou anammox (Pla46F, Amx368F, Amx820R) sont utilisées, la quantité relative de séquence anammox trouvée pour un échantillon donné augmente (Jetten et al., 2005; Penton et al., 2006). Récemment, des amorces spécifiques ont été développées pour la PCR quantitative afin de quantifier la biomasse des cellules anammox dans les stations de traitements des eaux (Tsushima et al., 2007).

L'hybridation *in situ* (FISH) est utilisée à la fois pour détecter et quantifier les bactéries anammox dans les échantillons environnementaux et de traitements des eaux usées. Cette technique permet de détecter à la fois les domaines, phyla, genres et espèces. Les sondes EUB338I, II, et III qui ciblent le gène codant pour l'ARNr16s bactérien ne permettent pas de détecter le phylum des Planctomycètes (Amann et al., 1990). La sonde EUB338IV est utilisée comme sonde universelle « bactérie » (Jetten et al., 2005).

Tableau 4 : Sondes utilisées pour la détection des organismes anammox (Jetten et al., 2005)

Nomenclature OPD ¹	Spécificité	Séquence 5'-3'	% Formamide/mM [NaCl] ²
S-D-Bact-0338-b-A-18	Bacteria	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	0/900
S-Planc-0046-a-A-18	<i>Planctomycetales</i>	GAC-TTG-CAT-GCC-TAA-TCC	25/159
S-*-BS-820-a-A-22	Candidatus « <i>Scalindua sorokini et wagneri</i> »	TAA-TTC-CCT-CTA-CTT-AGT-GCC	40/56
S-*-Scabr-1114-a-A-22	Candidatus « <i>Scalindua brodae</i> »	CCC-GCT-GCT-AAC-AAC-TAA-AAA	20/225
S-*-Kst-1275-a-A-20	Candidatus « <i>Kuenenia</i> »	TCG-GCT-TTA-TAG-GTT-TCG-CA	25/159

¹ OPD : Oligonucleotide Probe Database. Désignation.

² % de formamide dans le tampon d'hybridation et concentration en NaCl dans le tampon de lavage

La sonde Pla46F, spécifique des Planctomycètes, s'hybride avec le gène codant pour l'ARNr16s des bactéries anammox (Neef et al., 1998). Pour une détection plus spécifique des procaryotes anammox il existe plusieurs sondes. La sonde Amx368 a été dessinée pour la détection de tous les micro-organismes anammox (Jetten et al., 2005), la sonde Amx820 pour la détection de *Candidatus* « Kuenenia spp ». et *Candidatus* « Brocadia spp ». Afin de détecter ces genres distinctement, les sondes Kst1275 et Ban162 ont été dessinées pour s'hybrider avec *Candidatus* « Kuenenia spp ». et *Candidatus* « Brocadia spp » respectivement. La sonde Apr820 s'hybride préférentiellement avec *Candidatus* « Anammoxoglobus spp » (Kartal et al., 2007b). Les découvertes récentes de *Candidatus* « Scalindua spp » dans les environnements naturels et les stations de traitement des eaux usées montrent que les sondes utilisées jusqu'à présent ne sont pas suffisantes (Jetten et al., 2005). Aujourd'hui il existe des sondes spécifiques pour toutes les espèces anammox connues.

- Les lipides laddéranes

Les bactéries anammox ont des membranes constituées de lipides uniques appelés laddéranes qui sont d'excellents biomarqueurs (Kuypers et al., 2003; Schmidt et al., 2003; Kartal et al., 2007b). Les bactéries anammox produisent également des hopanes et des acides gras, cependant ils ne sont pas spécifiques des bactéries anammox (Sinninghe Damste et al., 2005). Les lipides des bactéries anammox sont caractérisés par un épaulement du ^{13}C par rapport à la source de carbone (CO_2) (Schouten et al., 2004).

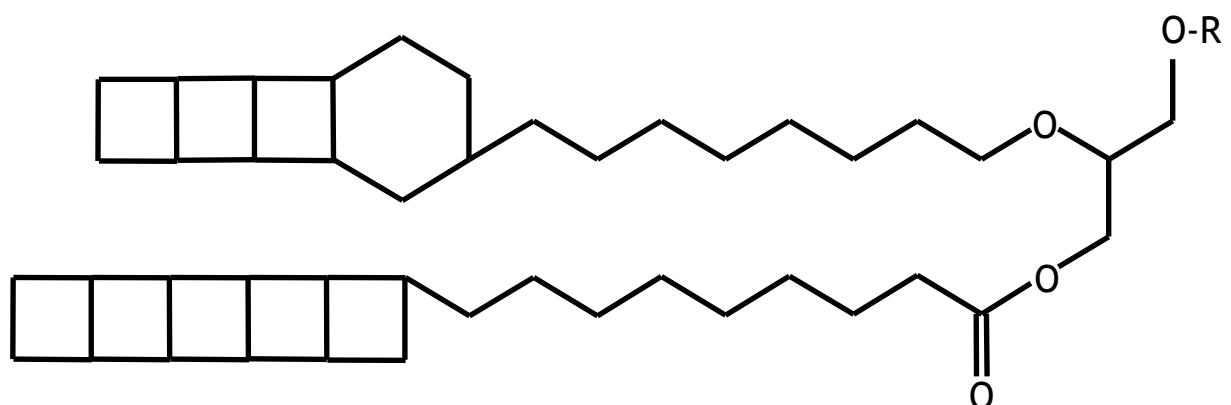


Figure 17: Schéma de la structure de lipides laddéranes (Sinninghe Damste et al., 2005)

- Mesure d'activité par des isotopes stables

Depuis la découverte du processus anammox, les bactéries anammox ont été détectées dans de nombreux écosystèmes naturels et sont pour le moment considérées comme des acteurs majeurs expliquant les pertes d'azote dans les océans – avec des proportions proches de la dénitrification (Rysgaard and Nøhr Glud, 2004; Rysgaard et al., 2004; Meyer et al., 2005). La contribution relative de la réaction anammox et de la dénitrification aux pertes d'azote en milieu marin, est estimée par l'incubation de sédiments ou d'eau dans des flacons étanches avec un excès d'azote marqué sous forme de ^{15}N - ammonium ou ^{15}N -nitrate (Thamdrup and Dalsgaard, 2002; Kuypers et al., 2005). Basé sur la stœchiométrie des réactions anammox et de la dénitrification, la contribution de ces deux processus peut être évaluée par la détermination du pourcentage d'azote marqué sur la totalité d'azote formé. En effet, la dénitrification transforme le ^{15}N - nitrate ou ^{15}N -nitrite en $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$, la réaction anammox produit exclusivement du $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ (en présence d'ammonium non marqué). Les ratios de $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ et $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ peuvent être déterminés par des rapports isotopiques en spectrométrie de masse (IR-MS). Ces expériences de marquages avec le $^{15}\text{NH}_4^+$ et $^{15}\text{NO}_2^-$ sont suffisantes pour quantifier l'activité anammox dans les échantillons environnementaux. En conditions anoxiques seules les espèces anammox sont capables de former du $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ à partir de $^{15}\text{NH}_4^+$ et $^{14}\text{NO}_2^-$.

4.2.2.4. Les bactéries anammox dans les environnements naturels (Figure 18)

Dans les environnements naturels, en conditions anoxiques, la dénitrification était considérée comme la seule voie expliquant les pertes d'azote. L'ammonium aurait donc dû s'accumuler en grande quantité dans la nature. Cependant, Richards en 1965 a mis en évidence des pertes d'azote inexplicables (Richards, 1965). La contribution du métabolisme anammox dans le cycle de l'azote a d'abord été largement sous estimée à cause du temps de doublement très long des bactéries anammox (Ward, 2000, , 2003). Cependant, l'activité et la présence des bactéries anammox dans la nature a été présentée dans le bassin de la Mer Noire (Kuypers et al., 2003) puis au niveau de la zone de minimum d'oxygène dans les systèmes d'upwelling du Bengale et du Pérou, sites importants de production primaire dans les océans Atlantique et Pacifique. Ceci a confirmé que les bactéries anammox contribueraient alors significativement aux pertes d'azote (Thamdrup and Dalsgaard, 2002; Kuypers et al., 2005; Hamersley et al., 2007). Les bactéries anammox et leur activité ont également été détectées

dans la partie anoxique de nombreux environnements marins et d'eau douce (Penton et al., 2006; Schubert et al., 2006; Schmid et al., 2007). Ces exemples n'illustrent pas seulement l'importance du processus anammox pour l'écosystème marin, mais également son implication importante dans de nombreux écosystèmes. Ces 5 dernières années, les bactéries anammox ont été reconnues comme des acteurs importants dans le cycle biogéochimique de l'azote (Devol, 2003; Ward, 2003; Arrigo, 2005; Francis et al., 2005; Brandes et al., 2007). Dans toutes ces études *Candidatus* « *Scalindua* spp » exclusivement ont été détectées (Kuypers et al., 2003; Kuypers et al., 2005; Penton et al., 2006; Schmid et al., 2007).

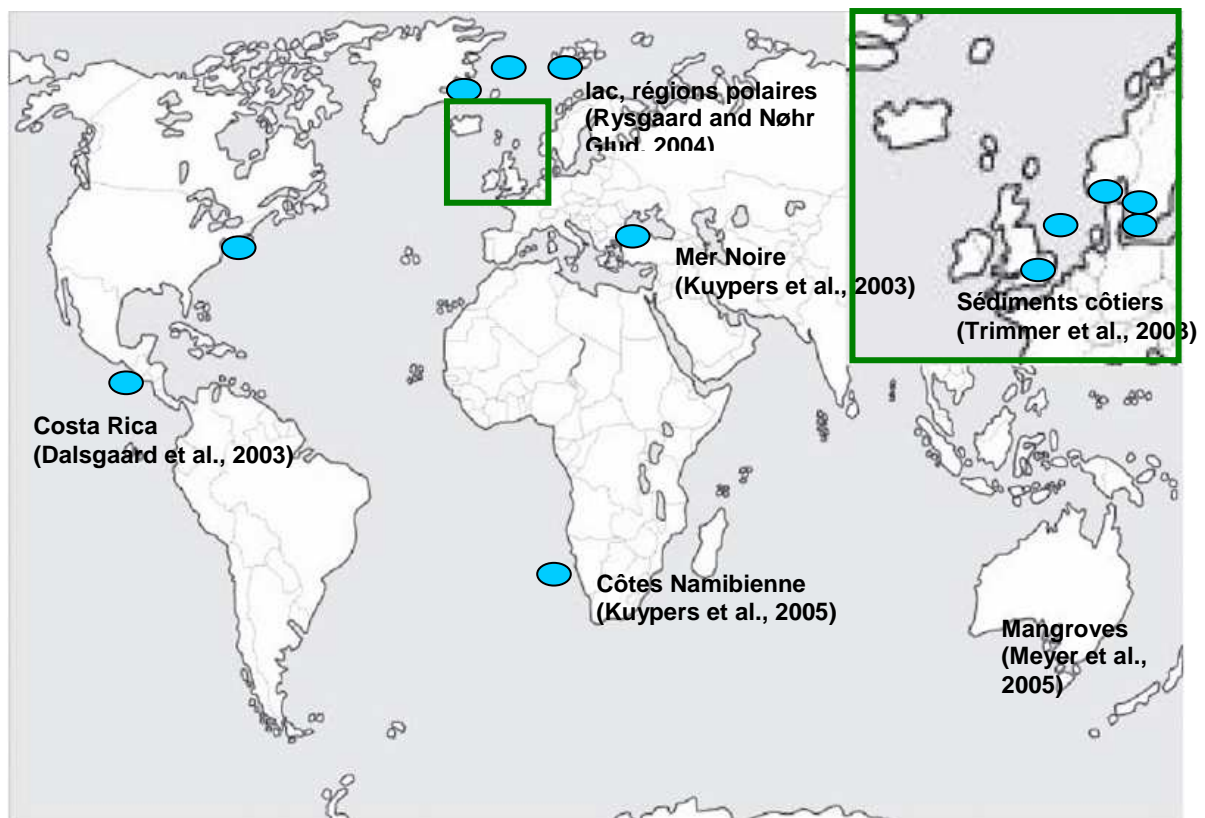


Figure 18: Localisation des principaux sites et écosystèmes où ont été mises en évidence des bactéries anammox (Schmid et al., 2007).

4.2.3. Le cycle de l'azote dans les édifices hydrothermaux actifs (Figure 19)

L'oxydation aérobie de l'ammonium ou nitrification a été démontrée par l'isolement des procaryotes nitrifiants hétérotrophes thermophiles se développant dans des conditions aérobies à 65°C comme par exemple *Bacillus* MS (Mével and Prieur, 1998; Mével and Prieur, 2000). La détection dans des échantillons d'édifices hydrothermaux actifs de séquences des

gènes *nifH* (codant pour une sous unité de la nitrogénase) laissait supposer une possible fixation de l'azote (Mehta et al., 2003). Une étude a récemment montré une possible fixation de l'azote à haute température par une *Méthanoarchaea* (Mehta and Baross, 2006). Cette *Archaea* issue de fluide hydrothermal est capable de réduire le diazote N_2 en ammonium NH_4^+ à une température de 92 °C. Le gène codant pour ARNr16S de ce fixateur hyperthermophile d'azote est 99% semblable à celui du *Methanocaldococcus jannaschii* (DSM 2661) qui elle ne fixe pas l'azote.

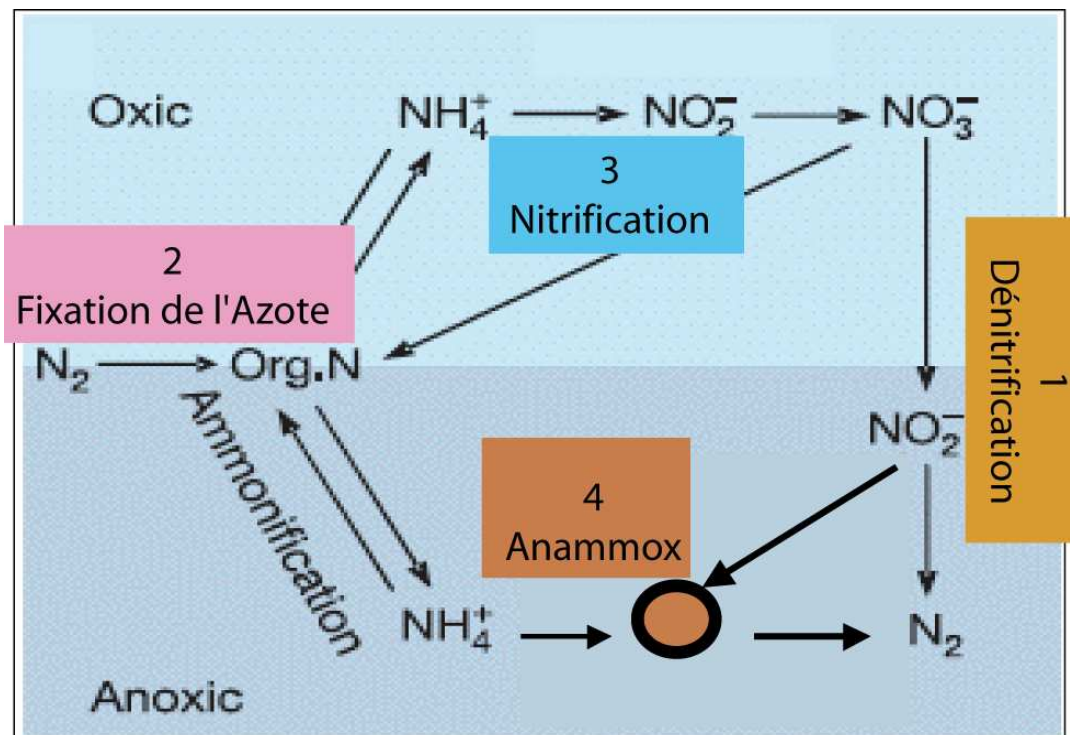


Figure 19: Cycle de l'azote simplifié en milieu hydrothermal, modifié d'après Kuypers et coll. (Kuypers et al., 2003)

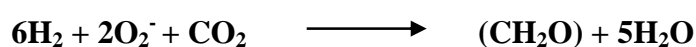
En ce qui concerne la dénitrification à haute température (1) de nombreux procaryotes ont été isolés et sont capables de cette réaction à haute température tels que des espèces bactériennes des genres *Deferrribacter* (Miroshnichenko et al., 2003b; Takai et al., 2003a), *Caminibacter* (Alain et al., 2002b; Miroshnichenko et al., 2004; Voordeckers et al., 2005) *Desulfurobacterium* (L'Haridon et al., 1998; Alain et al., 2003; L'Haridon et al., 2006b), *Persephonella* (Gotz et al., 2002; Nakagawa et al., 2003) et l'*Archaea Pyrolobus fumarii* (Blöchl et al., 1997), espèce qui détient d'ailleurs le record de température pour la dénitrification (106°C).

De nombreux essais ont été effectués afin d'enrichir ou d'isoler des micro-organismes nitrifiants autotrophes dans des environnements chauds, essais qui ne se sont pas avérés concluants.

4.3. Le cycle du Carbone

Le carbone est recyclé dans l'atmosphère, le sol, les océans, les milieux aquatiques, les sédiments et les roches. Les sédiments et les roches représentent le réservoir le plus important, mais le « turn over » y est très long. La voie globale la plus rapide de transfert de carbone se fait par le dioxyde de carbone (CO₂) qui est la forme initiale et finale du cycle. Il est retiré de l'atmosphère essentiellement par la photosynthèse des plantes et y retourne par la respiration des animaux, des plantes et des micro-organismes chimio-organotrophes. Les organismes photosynthétiques sont donc à la base du cycle du carbone. Les micro-organismes phototrophes possèdent un pigment leur permettant d'utiliser la lumière comme source d'énergie. Chez les procaryotes il existe deux types de photosynthèse : la photosynthèse oxygénique par exemple chez les *Cyanobactéries* qui produit de l'O₂ en utilisant l'H₂O comme donneur d'électrons et la photosynthèse anoxygénique qui utilise un composé réduit soufré ou un composé organique comme donneur d'électrons, respectivement chez les bactéries pourpres et vertes sulfureuses ou non. Le carbone fixé par photosynthèse est finalement dégradé par les procaryotes et il en résulte deux formes majeures : le méthane (CH₄) et le dioxyde de carbone (CO₂). Ces deux gaz sont formés par l'activité des méthanogènes. Dans les habitats anoxiques, le CH₄ est produit soit par la réduction du CO₂ soit à partir de composés organiques comme l'acétate. Le méthane produit dans les environnements anoxiques est insoluble et migre vers les environnements oxygénés où il est oxydé en CO₂ par les méthanotrophes ou par les micro-organismes oxydant le méthane en anaérobiose (AOM) dans les zones de transition méthane/sulfate.

Certains micro-organismes sont capables de croître en utilisant le CO₂ comme seule source de carbone, ce sont des autotrophes. Les hydrogénobactéries par exemple fixent le CO₂ via le cycle de Calvin suivant la réaction suivante :



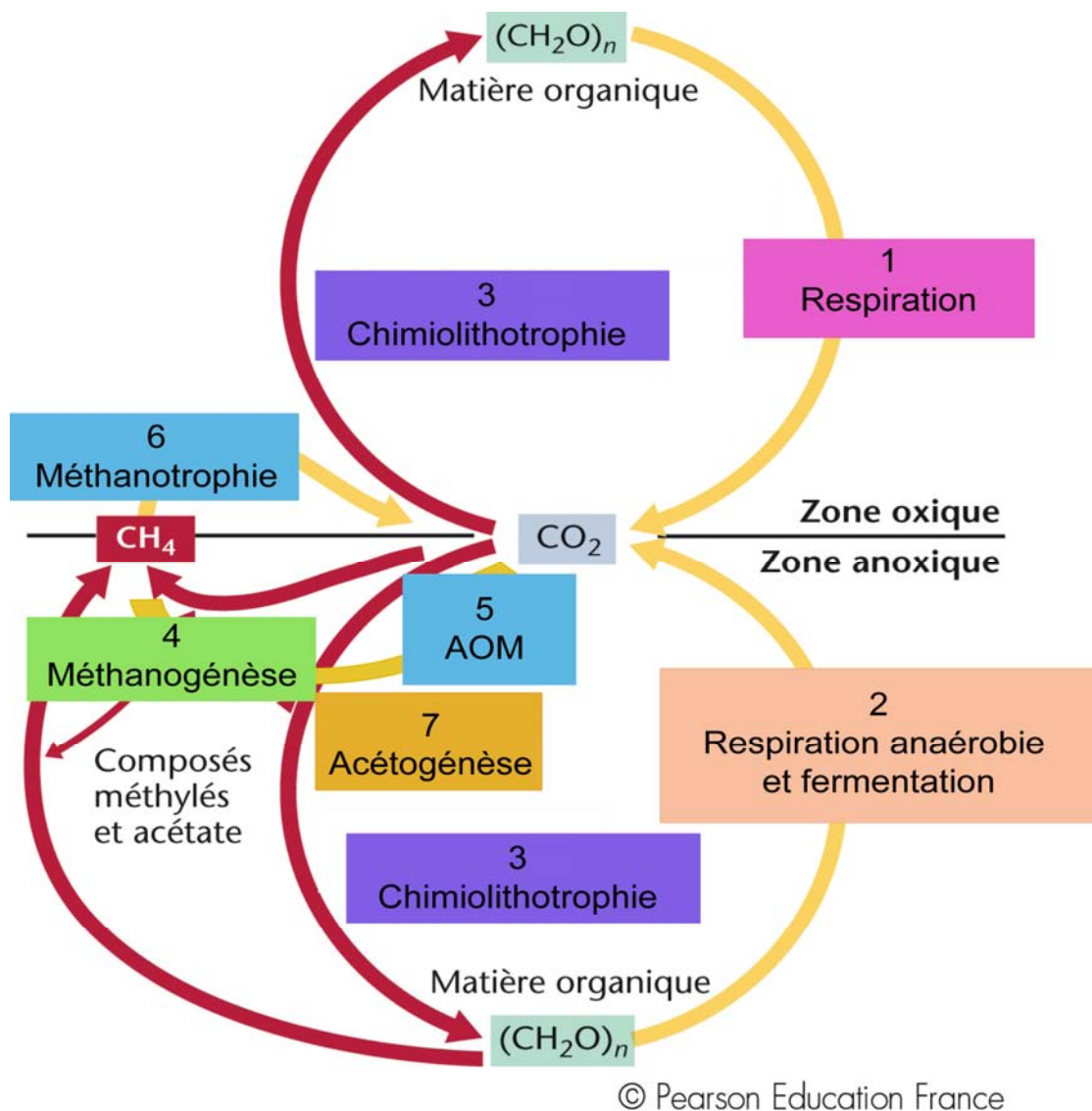


Figure 20: Principales réactions du cycle du Carbone d'après Brock Chapitre 19 (Madigan and Martinko, 2007)

- La respiration et fermentation (1) et (2) sur la Figure 20

Lors de la respiration, la matière organique est transformée en $CO_2 + H_2O$ en présence ou absence de lumière, en condition aérobie ou anaérobie.

Les chimio-organotrophes utilisent deux mécanismes de conservation de l'énergie : la fermentation et la respiration. Dans la fermentation, la réaction d'oxydation est couplée à la réduction d'un composé dérivé du donneur d'électrons. Dans la respiration c'est un accepteur

d'électrons exogène soit l'oxygène moléculaire (respiration aérobie) soit un autre accepteur d'électrons qui est réduit (respiration anaérobie).

Concernant l'écosystème hydrothermal et plus précisément la partie chaude de celui-ci plusieurs micro-organismes tirent leur énergie de la respiration aérobie : c'est le cas d'*Aeropyrum camini* et des espèces du genre *Thermus* par exemple. Certains sont microaérophiles, comme *Oceanithermus* et *Vulcanithermus*. Ils ont des températures optimales de croissance comprises entre 60°C et 85°C.

De nombreuses espèces sont impliquées dans la dégradation de la matière organique par voie fermentaire ou par respiration anaérobie. Elles appartiennent aux deux domaines *Archaea* et *Bacteria* et se répartissent au sein de différents phylums; *Firmicutes* (*Caminiella*), *Thermotogales* (*Marinotoga*, *Thermosipho*), *Thermales* (*Vulcanithermus*), concernant les *Bacteria*. Les *Thermococcales* au sein des *Euryarchaeota* qui comptent plus d'une vingtaine d'espèces décrites toutes chimioorganotrophes, les *Desulfurococcales* chez les *Crenarchaeota* qui comportent à la fois des espèces chimioorganotrophes et des espèces lithotrophes.

Parmi les espèces thermophiles et hyperthermophiles isolées des édifices hydrothermaux actifs, les espèces chimioorganotrophes sont celles pour lesquelles il existe le plus grand nombre d'espèces isolées et décrites notamment au sein de l'ordre des *Thermococcales* et dans une moindre mesure des *Thermotogales*. La physiologie et le métabolisme des *Thermococcales* sont bien connus (Neuner et al., 1990) (Miroshnichenko et al., 1989) (Zillig et al., 1987); (Godfroy et al., 1996) (Huber et al., 1995a); (Keller et al., 1995); (Kwak et al., 1995); (Dirmeier et al., 1998); (Grote et al., 1999); (Marteinsson et al., 1999); (Canganella et al., 1998); (Miroshnichenko et al., 1998); (Gonzalez et al., 1999); (Duffaud et al., 1998); (Godfroy et al., 1999); (Arab et al., 2000); (Jolivet et al., 2004); (Kuwabara et al., 2005); (Kuwabara et al., 2007); (Pikuta et al., 2007) et de nombreux génomes ont été séquencés. Elles sont capables d'utiliser des composés organiques complexes tels que des protéines mais également des sucres simples ou complexes. Leur métabolisme est un métabolisme fermentaire et leur croissance est stimulée par la présence de soufre élémentaire.

- Les micro-organismes chimiolithoautotrophes : Fixation du CO₂ (3) sur la Figure 20

Chez les procaryotes chimiolithotrophes, l'énergie nécessaire à la fixation du CO₂ est obtenue grâce à un donneur d'électrons inorganique. Dans les édifices hydrothermaux, de nombreux

composés réduits sont susceptibles de servir de sources d'énergie pour la fixation du CO₂ à haute température, l'hydrogène notamment est un donneur d'électrons. De nombreuses espèces de micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles autotrophes ont été isolées des édifices hydrothermaux. Elles sont capables d'utiliser des couples donneurs/accepteurs très divers et appartiennent aussi bien aux domaines des *Archaea* : genres *Ignococcus* (Huber et al., 2000), *Archaeoglobus* (Huber et al., 1997; Henstra et al., 2007), *Pyrolobus* (Blöchl et al., 1997), que des *Bacteria* : *Nautiliales* (Alain et al., 2002b; Miroshnichenko et al., 2002; Miroshnichenko et al., 2004; Voordeckers et al., 2005), *Desulfobacteriales* (Jeanthon et al., 2002), *Aquificales* (Nakagawa et al., 2003).

A haute température, la fixation du CO₂ est assurée par la voie de l'Acetyl CoA, par le biais du cycle de l'acide citrique inversé par exemple chez *Thermoproteus* (Schäfer et al., 1986) et *Aquifex* (Huber et al., 1992) ou par le biais du cycle de Calvin. Dans le cas du cycle de l'acide citrique inversé, des enzymes catalysent du CO₂ en des intermédiaires du cycle de l'acide citrique, impliquant la carboxylation de l'acétyl-CoA en α -cétoglutarate et la carboxylation de l'acétyl-CoA en oxaloacétate.

- La méthanogénèse (4) sur la Figure 20

Le méthane issu des processus biologiques (méthanogénèse) a une grande importance dans le flux de carbone au sein de nombreux environnements anoxiques. La méthanogénèse est réalisée par un groupe d'*Archaea*, les méthanogènes, qui sont des anaérobies strictes. La plupart des méthanogènes utilisent le CO₂ comme accepteur terminal d'électrons dans la respiration anaérobie, et le réduisent en méthane avec le di-hydrogène comme donneur d'électrons.

Au niveau des sources hydrothermales, des espèces d'*Archaea* méthanogènes thermophiles et hyperthermophiles ont été isolées telles que les espèces du genre *Methanocaldococcus jannaschii* (Jones et al., 1983), *Methanotorris formicicus* (Takai et al., 2004b), *Methanothermococcus okinawensis* (Takai et al., 2002) *Methanopyrus kandleri* (Burggraf et al., 1991). Ces espèces sont pour la plupart des espèces qui utilisent H₂ et CO₂ ce qui fournit des données supplémentaires sur l'évidence d'un métabolisme autotrophe en milieu hydrothermal océanique (Jeanthon et al., 1998; Jeanthon et al., 1999; L'Haridon et al., 2003). Dans certains environnements hydrothermaux comme au niveau du Bassin de Guaymas, l'acétate provenant de la dégradation thermogénique de la matière organique sédimentée, durant la phase précoce de la diagénèse, présent en concentration élevée est utilisé comme un

substrat important de la méthanogénèse par des *Méthanosarcinales* (seule famille pratiquant la méthanogénèse acétoclastique).

- L'homoacétogénèse (7) sur la Figure 20

Cette réaction correspond à un métabolisme énergétique impliquant la production d'acétate à partir de H_2 et CO_2 ou à partir de composés organiques. Il n'existe pour l'instant aucun micro-organisme hydrothermal acétogène identifié.

- La méthanotrophie (6) sur la Figure 20

Cette réaction correspond à l'oxydation du méthane en CO_2 . Les substrats carbonés en C1 sont arbitrairement définis comme des composés contenant un carbone plus réduit que le CO_2 et ne contenant pas de liaison C-C comme par exemple CO , CH_4 , CH_3OH , $HCOOH$, $HCHO$, mono, di et triméthylamine. En milieu hydrothermal, le métabolisme des composés en C-1 atteint un autre niveau de complexité, tenant compte de la distinction entre métabolisme microbien auto et hétérotrophe. Pour la plupart des écosystèmes hydrothermaux océaniques, le CH_4 est formé via des réactions abiotiques : serpentisation et « Fischer-Tropsch-Type (FTT) » à hautes températures impliquant H_2 et CO_2 (Charlou et al., 2002). Par conséquent la croissance basée sur le CH_4 peut être considérée comme une production primaire. A ce jour cependant, aucune espèce de méthanotrophe fonctionnant à haute température n'a été isolée de sources hydrothermales océaniques. Cependant des symbioses associant des micro-organismes méthanotrophes et des invertébrés ont été mises en évidence dans les zones à plus basse température (Duperron et al., 2005; Duperron et al., 2006), des espèces méthanotrophes ont été également détectées grâce à des inventaires moléculaires associés aux tapis microbien et à la crevette *Rimicaris exoculata*.

En plus du catabolisme aérobie du CH_4 , celui-ci peut également être oxydé en condition anaérobie au cours d'un processus *a priori* syntrophique impliquant la coopération d'*Archaea* nommées ANME et affiliées aux *Méthanosarcinales*, et de bactéries sulfato-réductrices (*Deltaproteobacteria*) ou nitrate-réductrice.

- L'oxydation anaérobie du méthane AOM (5) sur la Figure 20

Le méthane, produit dans les sédiments anoxiques, est oxydé en CO₂ par les méthanotrophes lorsqu'il atteint les zones oxygénées. Le méthane peut être oxydé en conditions anaérobies dans les sédiments marins par des consortia cellulaires contenant certaines bactéries sulfato-réductrices et des méthanogènes (Figure 21). La façon dont le méthane peut être oxydé par ces agrégats n'est pas encore connue avec précision. Cependant certaines hypothèses ont été suggérées, notamment la possibilité pour les méthanogènes de convertir le CH₄ en acétate, qui serait alors oxydé en CO₂ par les sulfato-réducteurs (Moran et al., 2008). Quelle que soit la façon dont fonctionne ce partenariat, l'oxydation anaérobie du méthane est indiscutablement un mécanisme de syntrophie dans lequel deux organismes coopèrent.

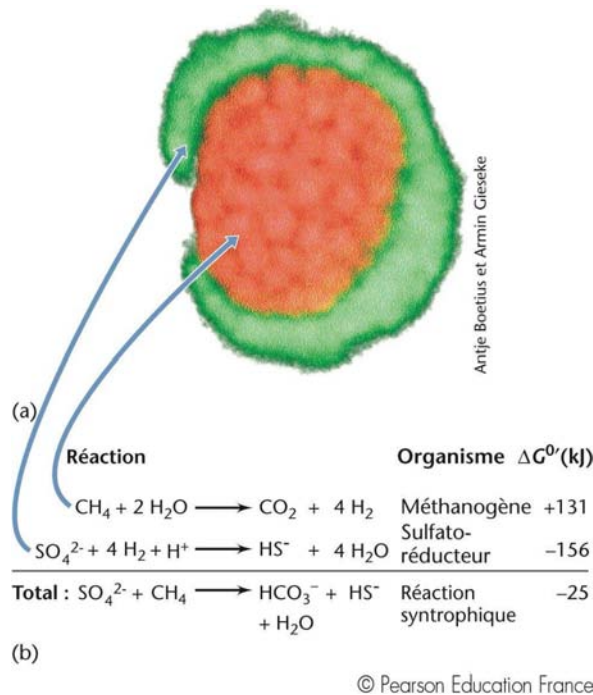
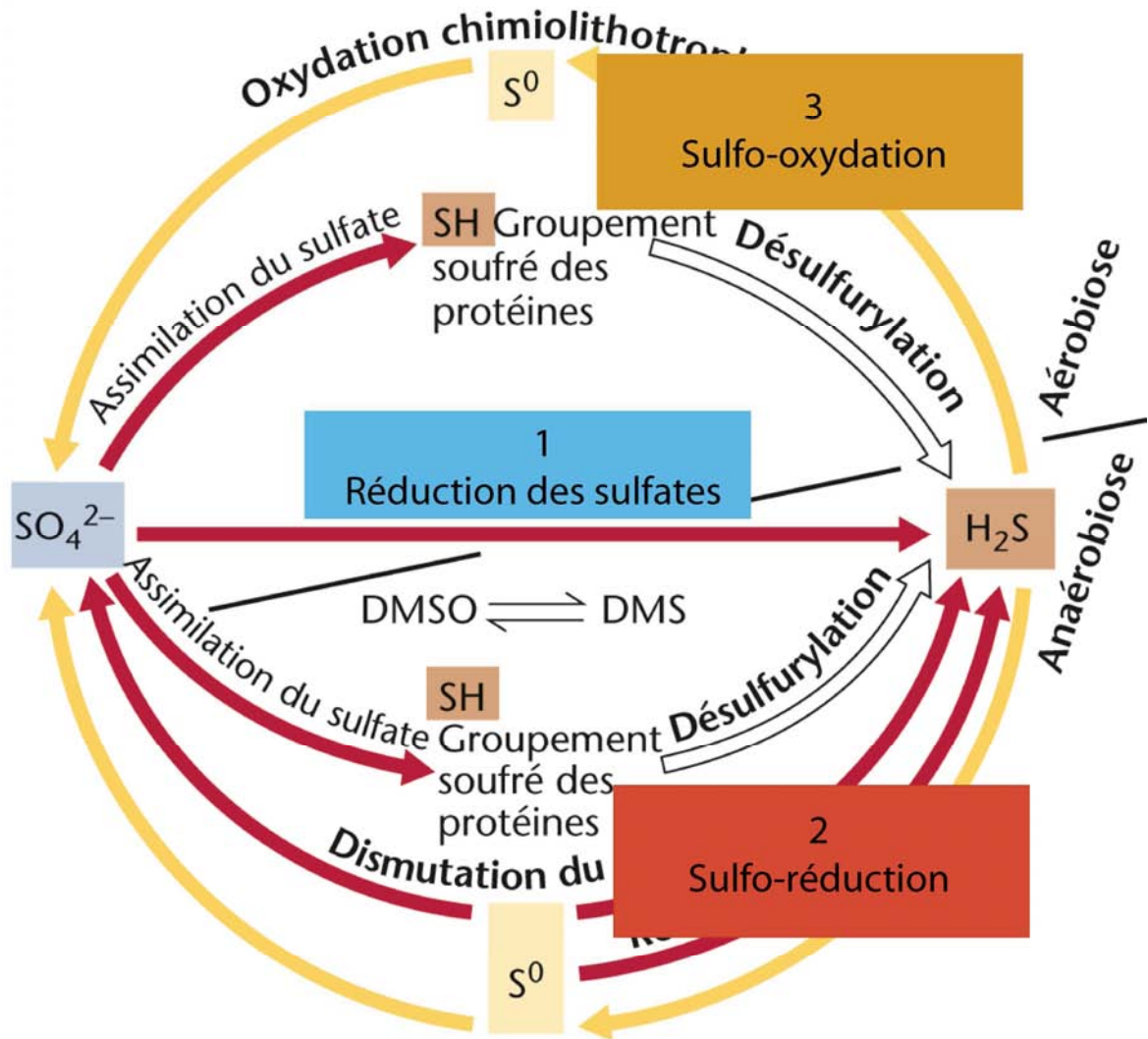


Figure 21 : Oxydation Anaérobie du Méthane (AOM) d'après Brock Chapitre 19, (Madigan and Martinko, 2007)

Le mise en évidence dans l'écosystème hydrothermal notamment au niveau des sédiments du bassin de Guaymas (Dhillon et al., 2005) et du site Lost City (Brazelton et al., 2006) de lignées ANME impliquées dans l'oxydation anaérobie du méthane, pourrait laisser supposer l'existence de l'AOM à des températures supérieures à celles décrites jusqu'à présent.

4.4. Le cycle du Soufre



© Pearson Education France

Figure 22: Principales réactions du cycle du Soufre d'après Brock, Chapitre 19, (Madigan and Martinko, 2007).

Le cycle biogéochimique du soufre et l'implication des micro-organismes dans les transformations de cet élément sont présentés dans la Figure 22. L'essentiel du soufre sur terre se trouve dans les sédiments et dans les roches sous forme de minéraux sulfatés (gypse, CaSO_4) et sulfurés (pyrite, FeS_2). Les océans constituent un des réservoirs majeurs de soufre pour la biosphère.

- Réduction des sulfates (1) sur la Figure 22

Le sulfate, la forme la plus oxydée du soufre, est l'un des anions majeurs de l'eau de mer. Il est utilisé comme accepteur terminal d'électrons par les bactéries sulfato-réductrices. Le produit final de la réduction des sulfates est l' H_2S , impliqué dans de nombreux processus biogéochimiques. Au cours de la réduction assimilative, l' H_2S formé est immédiatement converti en soufre organique sous forme d'acides aminés contrairement à la réduction dissimilative où de fortes concentrations d' H_2S sont produites (Rabus et al., 2006). Une importante diversité morphologique et physiologique de bactéries sulfato-réductrices est connue. À l'exception des espèces du genre archéen *Archaeoglobus*, tous les procaryotes sulfato-réducteurs connus appartiennent au domaine des Bacteria. Ils sont très majoritairement affiliés à la classe des *Deltaproteobacteria* dans lequel on trouve les genres *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* et *Desulfuromonas* et chez les *Firmicutes* avec des espèces du genre *Desulfotomaculum* (Pikuta et al., 2000). La gamme des donneurs d'électrons utilisés par les organismes sulfato-réducteurs est large mais la plupart utilisent l'hydrogène, le pyruvate ou le lactate. L'oxydation des substrats organiques chez les bactéries réduisant les sulfates peut être « complète » formant du CO_2 , ou « incomplète » avec de l'acétate et du CO_2 comme produits finaux (Rabus et al., 2006).

Au niveau des écosystèmes hydrothermaux, des bactéries thermophiles sulfatoréductrices de l'ordre des *Thermodesulfobacteriales*, *Thermodesulfobacterium hydrogenophilum* (Jeanthon et al., 2002) et *Thermodesulfatator indicus* ont été isolées d'un site de la « Ride Indienne » (Moussard et al., 2004). Une espèce de ce genre a été également isolée à partir d'échantillons de cheminée du site Rainbow (Postec et al., 2007; Alain et al., soumis) et est en cours de description. Ces espèces forment un phylum distinct positionné à la base de l'arbre des Bacteria. Au sein des Archaea des espèces du genre *Archaeoglobus* ont été isolées des édifices hydrothermaux actifs, (Burggraf et al., 1990; Huber et al., 1997; Mori et al., 2008). Leurs températures optimales de croissance varient de 70 à 85°C.

- Sulfo-Réduction (2) sur la Figure 22

Le soufre élémentaire (S^0) est chimiquement stable et insoluble. La réduction du soufre en sulfure (une forme de respiration anaérobie) est un processus écologique majeur, particulièrement chez les *Archaea* hyperthermophiles du genre *Desulfurococcus*.

Dans les édifices hydrothermaux actifs un grand nombre d'espèces décrites sont capables de réduire le S^0 , elles présentent des métabolismes divers. En effet, certaines chimioorganotrophes anaérobies fermentaires telles les *Thermococcales* et les *Thermotogales* sont capables de réduire le S^0 . Cette réaction n'est pas indispensable à leur croissance mais la stimule. Les *Thermotogales* réduisent également le soufre élémentaire ainsi que des composés soufrés plus oxydés tels que le thiosulfate. D'autre part on trouve des espèces pour lesquelles le S^0 est l'accepteur terminal d'électrons. Ces micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles des genres bactériens *Desulfurobacterium* (L'Haridon et al., 1998; Alain et al., 2003; L'Haridon et al., 2006b) *Balnearium* (Takai et al., 2003b) et *Thermovibrio* (Vetriani et al., 2004) qui forment une lignée distincte au sein des *Aquificales* et la *Crenarchaeota* *Ignicoccus pacificus* (Huber et al., 2000) sont des chimiolithoautotrophes.

- Sulfo-oxydation (3) sur la Figure 22

De nombreux composés soufrés réduits peuvent être utilisés comme donneur d'électrons par des bactéries sulfo-oxydantes. Les micro-organismes sulfo-oxydants, dont la plupart sont aérobies ou dénitrifiants, peuvent catalyser l'oxydation des sulfures. Cette réaction se produit généralement dans la zone de contact entre la zone anaérobie qui contient les sulfures et la zone aérobie qui contient l'oxygène. Nombre de micro-organismes sulfo-oxydants sont chimiolithotrophes ; ils appartiennent aux genres *Beggiatoa*, *Thiotrix*. Les bactéries du genre *Beggiatoa* oxydant l' H_2S accumulent le soufre à l'intérieur de la cellule qui constitue alors une réserve d'énergie. Le soufre élémentaire S^0 est une forme stable qui peut néanmoins être oxydée par des bactéries sulfo-oxydantes des genres *Thiobacillus* ou *Acidithiobacillus* mais également par des *Archaea* de l'ordre des *Sulfolobales*. L'un des produits de la réaction d'oxydation du soufre est l'ion H^+ , ce qui tend à diminuer le pH du milieu. Les bactéries sulfo-oxydantes sont ainsi capables d'entraîner une acidification du milieu. Les *Bacteria* phototrophes pourpres et quelques chimiolithotrophes sont capables d'oxyder les composés soufrés réduits en anaérobiose.

Dans l'écosystème hydrothermal, la présence de concentrations élevées en composés soufrés réduits fait de ces substances une source d'énergie essentielle au fonctionnement de l'écosystème. L'oxydation des composés soufrés réduits par des procaryotes est une des réactions principales de production d'énergie nécessaire à la fixation du CO_2 . Ces réactions sont réalisées par des micro-organismes vivant en symbiose avec certains invertébrés hydrothermaux (exemple : *Riftia* et *Bathymodiolus* pour l'EPR et *Bathymodiolus* pour MAR)

mais également par des bactéries filamenteuses sulfo-oxydantes (Ordre des *Thiotrichales*) qui peuvent former d'épais tapis sur les animaux ou sur le substrat.

Dans les édifices hydrothermaux actifs, seules deux espèces bactériennes appartenant à l'ordre des Aquificales *Persephonella marina* et *Persephonella guaymanensis* ont été isolées sur un site du Pacifique (Gotz et al., 2002; Nakagawa et al., 2003). Elles sont capables d'oxyder le S^0 ou le thiosulfate en microaérophilie et ont une température optimale de croissance de 70°C.

Les cycles biogéochimiques fonctionnent-ils à haute température au niveau des sources hydrothermales océaniques ? Comme nous l'avons noté précédemment de nombreux travaux ont été effectués et ont permis l'isolement et la description de nouveaux genres et espèces thermophiles et hyperthermophiles appartenant aux domaines des *Archaea* et des *Bacteria*. Cependant, pour certaines réactions des cycles biogéochimiques, aucun micro-organisme thermophile ou hyperthermophile n'a encore été isolé et identifié comme étant un acteur de ce processus biogéochimique. Les mesures des activités microbiennes en ce qui concerne les cycles biogéochimiques principaux (C, N, S, etc.) sont très rares et sont principalement effectuées dans les parties froides des écosystèmes. En conséquence, la question du fonctionnement complet des cycles biogéochimiques aux températures élevées (>60°C) est encore ouverte. Les données métaboliques obtenues à partir des nouvelles espèces isolées permettent d'identifier et d'associer des micro-organismes à certaines réactions des cycles biogéochimiques: c'est le cas par exemple du cycle de l'azote où des thermophiles réduisant les nitrates ont été identifiés, mais aucun micro-organisme oxydant l'ammonium au dessus de 60°C n'a été isolé. Il en est de même pour les autres cycles biogéochimiques et leur fonctionnement à haute température.

Lors de cette étude, notre choix s'est porté sur la recherche d'une oxydation anaérobie de l'ammonium à haute température. En effet, la présence de nitrate, nitrites et ammonium a été détectée dans cet environnement et le long du gradient de température. Ces facteurs associés aux conditions d'anaérobiose semblaient favorables à la présence de micro-organismes impliqués dans le métabolisme anammox, suggérant ainsi la possible présence de ceux-ci dans des environnements chauds. Les travaux réalisés pour rechercher la présence de micro-organismes anammox ont consisté en l'analyse moléculaire des échantillons (amplification du gène codant pour l'ARNr16S, clonage et séquençage, et FISH) et des mesures d'activités.

D'autre part, des cultures d'enrichissement en continu en bioréacteur ont été effectuées à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales en appliquant des conditions de culture

spécifiques visant à se rapprocher au mieux des conditions de l'environnement. L'utilisation de faibles, voire très faibles concentrations en matière organique, simulant des conditions d'oligotrophie a été mise en place afin de limiter la croissance des hétérotrophes et d'accéder à de nouveaux micro-organismes de l'écosystème hydrothermal.

Après un chapitre « Matériel et Méthodes », présentant en deux parties distinctes les méthodes utilisées, les résultats seront présentés en deux parties :

Partie 1 :

Recherche de micro-organismes anammox (Oxydation Anaérobie de l'Ammonium) dans les écosystèmes océaniques profonds.

Partie 2 :

Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des édifices hydrothermaux actifs.

Etude 1 : Etude des variations des conditions de l'environnement sur la culture de communautés microbiennes de cheminées hydrothermales en bioréacteur.

Etude 2 : Le fluide hydrothermal utilisé comme base du milieu de culture dans une culture d'enrichissement en bioréacteur.

Matériel et Méthodes

1. Recherche de micro-organismes Anammox dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds

*Une partie des manipulations a été réalisée avec un étudiant de Master II (Microbiologie)
Valentin CREPEAU et Jean louis BIRRIEN, Ingénieur de recherche*

1.1. Echantillons

Tableau 5 : Echantillons biologiques étudiés, localisation géographique et température mesurée sur le lieu du prélèvement

Echantillons		T°C
Tapis microbien Mat 1 MO22	Lucky Strike (depth: 1700m) Microbial mat on <i>Bathymodiolus azoricus</i>	4-8°C
Tapis microbien Mat 2 MO23	Lucky Strike (depth: 1700m) Microbial mats	4-8°C
Modioles 2 Mussels 2 MO16 E2	Menez Gwen (depth: 850m) <i>Bathymodiolus azoricus</i>	4-10°C
Crevette 1 Shrimp 1 EXO6 E1	Rainbow (depth :2300m) <i>Rimicaris exoculata</i>	4-10°C
Cheminée 1 Chimney 1 EXO5 E1	Lucky Strike (depth :1700m) Active chimney (iron silica)	30°C ¹
Cheminée 4 Chimney 4 EXO17 E1	Lost City (depth: 750m) Carbonate active chimney pH 10	91°C ¹
Cheminée 3 Chimney 3 EXO16 E1	Lost City (depth: 750m) Carbonate active chimney pH 10.	93°C ¹
Cheminée 6 Chimney 6 EXO13E1	TAG (depth :3650m) Active chimney	> 100°C
Cheminée 7 Chimney 7 EXO14	TAG (depth :3650m) Active chimney	> 100°C
Cheminée 8 Chimney 8 MO8 E1	Rainbow (depth: 2300m) Active chimney	> 100°C
Cheminée 10 Chimney 10 MOM07	Rainbow (depth: 2300m) Active chimney	153°C

Les échantillons proviennent des campagnes EXOMAR en 2005, MoMARETO en 2006 et MomarDreamNaut en 2007 et ont été prélevés sur les sites de Rainbow (36,2°N ; 33,9°W), Lucky Strike (37,29°N ; 32,28°W), Lost City (30,07°N ; 42,07°W) et Menez Gwen (37,85°N

; 31,51°W). Le choix des échantillons à traiter est réalisé de façon à varier la nature et le lieu de prélèvement de ces derniers (Tableau 5) et de façon à ce que les différents biotopes de l'écosystème soient échantillonnés et ce le long du gradient de température.

Les échantillons solides (cheminées et modioles) ont été prélevés par la pince téléopérée du ROV et transférés vers la surface dans une boîte étanche décontaminée. Les crevettes ont été prélevées par un aspirateur à faune et les échantillons de tapis microbien grâce à un préleveur d'eau par pompage, puis récupérés par filtration (sur filtre à, 22 µm).

Pour les mesures d'activités anammox, les échantillons ont été conditionnés en anaérobiose sous atmosphère d'argon à 4°C. Pour les extractions d'ADN et les techniques de FISH, les échantillons ont été broyés puis respectivement placés à -80°C ou fixés 2 heures dans de l'eau de mer formolée à 3%, puis conservés dans un mélange PBS 2X/éthanol à un ratio 1/1) (Jetten et al., 2005).

1.2. Etude moléculaire.

1.2.1. Extraction de l'ADN total

Les extractions sont réalisées avec le kit FastDNA[®] (Qbiogene, Inc, CA). Les échantillons conditionnés pour le FISH sont également utilisés pour les extractions d'ADN. Dans ce cas ils sont préalablement lavés avec une solution de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) afin d'éliminer l'éthanol dans lequel ils étaient conservés suite à la préparation pour la méthode de FISH. Pour chacun des échantillons, quatre extractions sont réalisées et les solutions d'ADN obtenues sont ajoutées et concentrées avec une unité Microcon YM-100[®] (Milipore, Inc).

1.2.2. Amplification, clonage et séquençage

Une amplification par PCR (Polymerase Chain reaction) est réalisée avec une combinaison de 3 amorces spécifiques du gène de l'ARNr16S des *Planctomycetes* anammox : Pla46F (5'-GGATTAGGCATGCAAGTC-3'), BS820R (5'-TAATTCCTCTATTAGT-3') et Amx820R (5'-AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC-3') (Jetten et al., 2005).

Le programme de PCR débute par une phase de dénaturation (10 minutes à 94°C) suivie par 35 cycles de dénaturation (1 minute à 94°C), d'hybridation (1 minute à 56°C) et d'élongation (1'30'' minute à 72°C) ; il se termine par une dernière phase d'élongation de 12 minutes à 72°C

Les fragments amplifiés par PCR sont clonés en utilisant le kit pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega) suivant les indications du fabricant. Le séquençage est réalisé à la Plate-forme de séquençage génotypage OUEST-genopole[®].

1.2.3. Analyse des séquences et phylogénie.

L'édition, l'alignement et l'analyse des séquences pour la construction d'un arbre phylogénétique sont réalisés avec les programmes suivants : BioEdit version 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), ClustalW (Thompson et al., 1994) et Phylo_Win (Galtier et al., 1996). Un arbre construit avec la méthode du neighbor-joining a été généré. La valeur de « bootstrap » a été calculée après l'analyse de 5000 arbres. Pour comparaison un arbre réalisé avec la méthode du maximum de parcimonie a également été généré.

Le taux en bases Guanine et Cytosine (G+C%) des séquences utilisées lors de la construction de l'arbre ont également été calculées pour analyse.

1.2.4. Analyse des échantillons par Hybridation Fluorescente in situ (FISH).

Les échantillons conditionnés pour le FISH subissent différents traitements préalablement à la phase d'hybridation. Ces traitements ont pour but de s'affranchir d'une partie de l'auto fluorescence produite par la présence de minéraux dans l'échantillon.

- Aucun traitement supplémentaire

L'échantillon broyé et fixé dans de l'eau de mer formolée à 3% est utilisé tel quel.

- Sonication

500µL d'échantillon sont traités par sonication pendant 30 min à 47Hz en utilisant un bain de sonication Branson[®] ultrasonic cleaner. L'échantillon est ensuite centrifugé 10 minutes à 750g. Le surnageant est récupéré puis utilisé pour l'hybridation (Furtado and Casper., 2000).

- Sonication et gradient de densité

500µL d'échantillon sont traités par sonication pendant 30 min à 47Hz en utilisant un bain de sonication Branson[®] ultrasonic cleaner. 500µL de Percoll – une solution de silice colloïdale

de faibles viscosité et osmolarité – est ajoutée à l'échantillon qui est ensuite centrifugé 10 minutes à 750g. Le surnageant contenant les cellules – du fait du gradient de densité généré par le Percoll – est récupéré puis utilisé pour l'hybridation.

- Sonifications multiples et concentration des surnageants

500µL d'échantillon sont traités par sonication pendant 30 min à 47Hz en utilisant un bain de sonication Branson® ultrasonic cleaner. L'échantillon est ensuite centrifugé 10 minutes à 750g. Le surnageant est récupéré et le culot resuspendu dans 500µL de PBS 1X. L'opération est répétée à quatre reprises, les surnageants sont ajoutés et centrifugés 15min à 15000 g. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot resuspendu dans 50µL de PBS 1X (Chevaldonné and Godfroy, 1997).

Protocoles d'hybridation.

Différentes sondes ciblant le gène de l'ARNr 16S de groupes spécifiques ont été utilisées de façon conjointe sur les échantillons (Tableau 6) (Jetten et al., 2005).

Tableau 6 : Sondes utilisées lors des protocoles d'hybridation.

Nomenclature OPD	Spécificité	Séquence 5'-3'	% Formamide/mM [NaCl] ²
S-D-Bact-0338-b-A-18	Universelles bactéries	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	0/900
S-Planc-0046-a-A-18	<i>Planctomycetes</i>	GAC-TTG-CAT-GCC-TAA-TCC	25/159
S-*-BS-820-a-A-22 (Kuypers et al., 2003)	<i>Candidatus Scalindua sorokini</i> et <i>wagneri</i>	TAA-TTC-CCT-CTA-CTT-AGT-GCC	40/56
S-*-Scabr-1114-a-A-22 (Jetten et al., 2005)	<i>Candidatus Scalindua brodae</i>	CCC-GCT-GCT-AAC-AAC-TAA-AAA	20/225
S-*-Kst-1275-a-A-20	Genre <i>Candidatus Kuenenia</i>	TCG-GCT-TTA-TAG-GTT-TCG-CA	25/159
S-S-Kst-0157-a-A-18	Genre <i>Candidatus Kuenenia</i>	GTT-CCG-TTT-GCT-CGA-AAC	25/159

¹OPD : Oligonucleotide Probe Database.

²Pourcentage de formamide dans le tampon d'hybridation et concentration en NaCl dans le tampon de lavage requis pour une hybridation *in situ* spécifique.

Ces sondes sont marquées à la fluoresceine (émission à 537,5nm), ou à l'indocarbocyanine Cy3 (émission à 507,5nm). Les hybridations ont été réalisées sur des lames recouvertes de téflon (PTFE) suivant le protocole défini par Amann *et coll.* et modifié par Jetten *et coll.* (Amann et al., 1990; Jetten et al., 2005).

1.3. Recherche de lipides ladderanes

Ces travaux ont été réalisés par Stefan Schouten et Andrea Jaeschke, Royal Netherlands Institute for Sea Research, The Netherlands.

Les lipides ladderanes (phosphocholine-monoalkylether) sont extraits par ultrasons à partir de quatre échantillons de cheminée (4 grammes de poids sec par échantillon des cheminées 4, 6, 7 et 10, tableau 5) selon une méthode modifiée de Bligh et de Dyer (1959). L'extraction se fait en trois phases successives en utilisant un mélange de méthanol, de dichlorométhane et de phosphate à pH 7,4 (2:1:0.8 v/v/v). Les extraits sont combinés et un volume de dichlorométhane est ajouté au mélange pour obtenir un rapport final de méthanol/dichlorométhane de 1:0.9 (v/v). Les phases sont ensuite séparées. Une partie de l'extrait est aliquotée et dissoute dans un mélange dichlorométhane/méthanol (9:1, v/v) puis filtrée à l'aide d'un filtre 0.45 μm de diamètre de 4 mm. Le C₂₀-[3]-ladderane – PC - monoalkylether contenant une tête phosphocholine (PC) (pour la structure voir Figure 23 est analysé par chromatographie liquide à ionisation-MS/MS selon la méthode modifiée de Boumann et al. (2006) (Boumann et al., 2006).

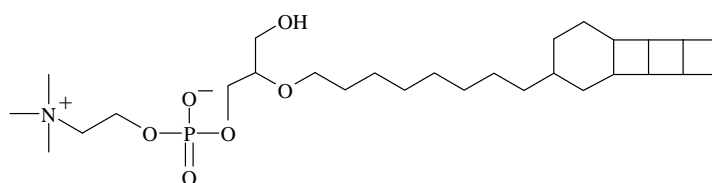


Figure 23: Structure du C₂₀-[3]-ladderane –PC-monoalkylether

1.4. Recherche de l'activité anammox par marquage isotopique.

Ces mesures d'activité ont été effectuées à l'université de Nijmegen (Pays Bas) dans le «Department of Microbiology, Institute for Water and Wetland Research, Radboud University Nijmegen».

La recherche d'activité Anammox est effectuée sur 5 échantillons de cheminée, les échantillons organiques n'ont pu être conservés dans de bonnes conditions à 4°C. Les protocoles utilisés sont ceux définis par Jetten 2005 (Jetten et al., 2005) et modifiés ainsi :

11mL d'échantillon (11 g d'échantillon) ont été placés dans des tubes exaitener de 12mL et il y est ajouté des nitrites marqués ($^{15}\text{NO}_2^-$) ou de l'ammonium ($^{15}\text{NH}_4^+$) de façon à obtenir une concentration finale de 20 μM . Les tubes sont ensuite balayés à l'hélium ou l'argon afin d'éliminer toutes traces de diazote, puis incubés 20, 44 et 68 h à 30, 60 et 85°C. Au terme de l'incubation la composition de la phase gazeuse a été analysée par spectrométrie de masse (ThermoFinnigan Delta^{plus} Isotope Ratio Mass Spectrophotometer).

2. Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des édifices hydrothermaux actifs : Approche culturelle en bio-réacteur gas lift

Ces expérimentations ont été réalisées avec le soutien technique de Françoise Lesongeur.

2.1. Cheminée hydrothermale et échantillonnage

Les échantillons utilisés ont été prélevés lors des campagnes EXOMAR (Chef de mission : Anne Godfroy) en 2005 et MoMARETO (chefs de mission : Jozée Sarrazin et Pierre-Marie Sarradin) en 2006. Ces campagnes se sont déroulées sur la Dorsale Médio-Atlantique. L'échantillon EXO15E1 provient du site hydrothermal TAG et l'échantillon MO3E1 provient du site Lucky Strike. Les morceaux de cheminée active ont été collectés par le ROV Victor 6000 (Remote Operated Vehicle) et remontés à la surface dans une boîte étanche décontaminée. A bord, les cheminées ont été sous échantillonnées, broyées en présence d'eau de mer stérile, dans une enceinte anaérobie, sous atmosphère gazeuse $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{CO}_2$, 90:5:5 (La Calhene, France) puis stockée à 4°C dans des flacons pénicilline en anaérobiose (atmosphère gazeuse $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{CO}_2$, 90:5:5). Les 2 échantillons ont servi d'inoculum pour deux cultures d'enrichissement réalisées au laboratoire (EXO15E1) et une culture réalisée à bord du navire océanographique « Pourquoi pas? » (MO3E1). Des échantillons ont également été conditionnés à -80°C jusqu'à leur utilisation en vue de l'extraction d'ADN et ont fait l'objet d'une analyse moléculaire basée sur l'étude des gènes codant pour les ARNr16s.

2.2. Approche culturelle en bio-réacteur

2.2.1. Les bioréacteurs gas-lift

2.2.1.1. Le bioréacteur de laboratoire (Figure 24)

Ce système de culture a été développé pour l'étude et l'optimisation des conditions de culture de *Pyrococcus furiosus* (Raven et al., 1992) puis utilisé au laboratoire de Microbiologie des

Environnements Extrêmes pour l'étude physiologique et la production de biomasse de *Pyrococcus abyssi* (Godfroy et al., 2000) et de *Thermococcus hydrothermalis* (Postec et al., 2005a). Dans le cadre de l'exploration de la diversité des sources hydrothermales océaniques profondes, cet outil a été mis en œuvre pour cultiver des communautés microbiennes des édifices hydrothermaux actifs, afin d'accéder à de nouveaux micro-organismes.

Description du système de culture (Godfroy et al., 2006)

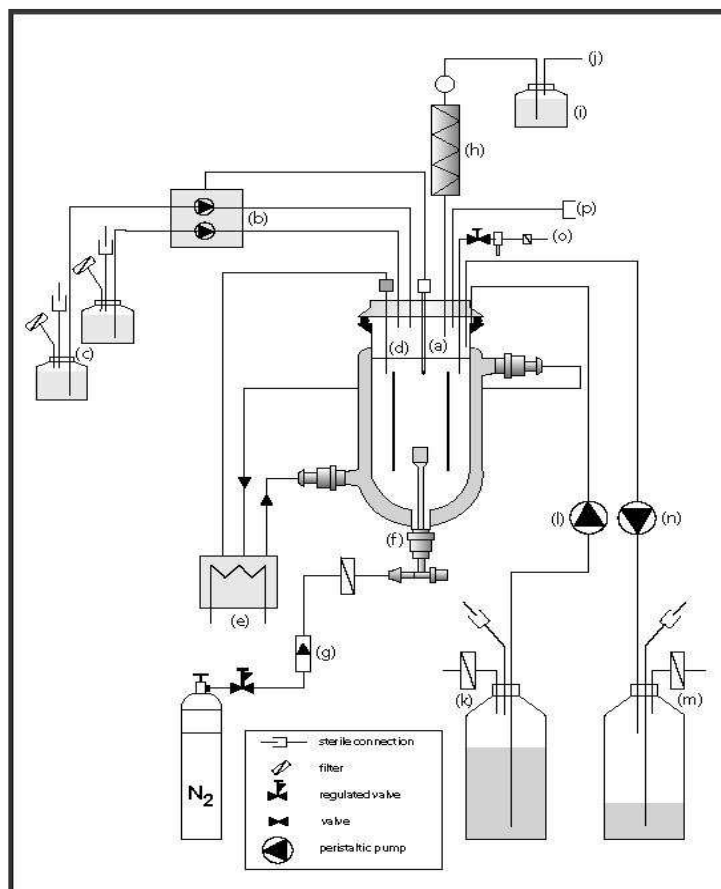


Figure 24:-Schéma du système expérimental pour la réalisation de cultures en continu avec le bioréacteur “Gas lift” (a) sonde pH; (b) contrôleur pH; (c) flacons acide et base; (d) sonde de température; (e) bain thermostaté; (f) système de balayage gazeux; (g) débitmètre gaz; (h) condenseur; (i) piège ; (j) sortie effluent gazeux; (k) réservoir de milieu de culture; (l) pompe péristaltique d’addition du milieu; (m) culture; (n) pompe péristaltique de soutirage de culture; (o) système de prélèvement; et (p) septum d’inoculation

La cuve en colonne fabriquée par la société Radley’s (UK) est en verre borosilicaté et possède une double enveloppe qui permet le maintien de la température du milieu, grâce à une circulation d’eau chauffée, ou éventuellement d’huile pour des températures

supérieures à 95°C avec un bain marie circulant (Huber). Le volume utile est de deux litres. Un cylindre en verre appelé « draft tube » est positionné à l'intérieur de la cuve, il permet d'homogénéiser le bullage gazeux au sein du milieu de culture grâce aux courants de convection qu'il génère.

Le **balayage gazeux** a pour but principal d'établir des conditions d'anaérobiose et d'apporter H₂ et CO₂. Le balayage gazeux favorise également l'homogénéisation du milieu de culture et permet l'élimination des produits du métabolisme microbien volatils (acide organique, H₂S,) potentiellement toxiques pour les micro-organismes. Un diffuseur en verre fritté à porosité optimisée, assure la distribution en gaz entrant dans la cuve du fermenteur sous forme de petites bulles. Il est fixé au fond de la cuve par un bouchon vissant en téflon. Ce bulleur est relié à un débitmètre à bille (Aalborg) par l'intermédiaire d'un tuyau Masterflex et d'un filtre 0.22 µm Acro50 relié à l'arrivée de gaz. Le mélange gazeux utilisé peut être de l'azote ou un mélange gazeux de composition définie. Dans notre étude un mélange N₂/H₂/CO₂ (75/20/5) a été utilisé. Dans ce cas là, le mélange gazeux est réalisé grâce à des débitmètres massiques (EL-FLOW, Air Liquide, France).

Une **platine** en Teflon est fixée sur la partie supérieure de la cuve grâce à un collier en inox, l'étanchéité est assurée par un joint torique. Elle est percée des entrées suivantes :

- 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 via un condenseur en verre
- huit entrées de 5 mm de diamètre qui sont utilisées pour l'addition d'acide, de base, l'entrée du milieu et le soutirage de la culture, le système de prélèvement et d'inoculation ; par l'intermédiaire de tubes en verre.

L'étanchéité est assurée par un empilement de cinq joints toriques. Lorsqu'elles ne sont pas utilisées les entrées peuvent être condamnées par des tiges de verre plein.

La sonde de température est une sonde classique PT 100 recouverte de Teflon PTFE.

La **sonde de pH** est une électrode stérilisable à gel (Mettler Toledo)

Le **condenseur** est un condenseur classique de chimie en verre. Il est relié à un bain réfrigérant contenant de l'eau refroidie à 10°C dont la circulation continue permet la

condensation des vapeurs d'eau de l'effluent gazeux en sortie de cuve, dues aux températures élevées.

Les **lignes d'entrée et de sortie** du milieu de culture en tuyau Tygon Silicone (Masterflex Norton) assurent la liaison entre le bioréacteur et les deux bidons en polypropylène (Nalgène). Ces bidons de 20 litres sont équipés d'un bouchon vissant percé de trois entrées dont un évent fermé par un filtre (0.22 μm , Gelman). Les entrées et les sorties de milieu sont assurées par des pompes péristaltiques (Masterflex). La pompe d'entrée permet de fixer le débit d'arrivée du milieu, et ainsi le taux de dilution de la culture. Lorsque le milieu frais contient du soufre il est placé sous agitation afin de maintenir celui-ci en suspension. Deux lignées d'entrées acide et base, (HCl 1N) et (NaOH 1N) sont réalisées de façon similaire. Les solutions sont contenues dans un flacon Nalgène de 750ml équipé d'un bouchon vissant à trois entrées.

La régulation du pH et de la température est assurée par un système analogique de contrôle : le *NBS BioCommand Interface* (4-20 mA controller). Il est relié à un ordinateur et associé au logiciel *NBS Local Controller*. Ce logiciel collecte les mesures du pH-mètre et de la sonde de température d'une part. D'autre part, il commande les pompes d'addition d'acide et de base ainsi que le bain-marie programmable (Huber) afin d'ajuster les valeurs de pH et de température mesurées aux valeurs de consigne fixées par l'expérimentateur. Le logiciel informatique *AFS BioCommand* permet d'acquérir et de stocker l'ensemble des paramètres mesurés au cours d'une fermentation. Le système analogique et les deux logiciels sont conçus par la société New-Brunswick (Nijmegen, Pays-Bas).

2.2.1.2. « Baby gas lift » : le bioréacteur embarquable.

Le fermenteur « baby gas lift » a été conçu spécialement pour pouvoir être utilisé à bord des navires océanographiques. Le principe de fonctionnement est le même que le fermenteur utilisé au laboratoire, le volume de la cuve est de 850 ml ; les proportions hauteur /diamètre et diamètre du « draught tube » ont été conservées afin de maintenir des conditions optimales de balayage gazeux de la cuve.

Dans le cas du baby gas-lift, la platine est en verre et percée de seulement 8 entrées réparties comme suit :

- une entrée centrale de 6 mm destinée à l'électrode de pH (Cole Palmer)
- une entrée de 8 mm destinées à la sonde de température et
- 4 entrées de 5 mm de diamètre qui sont utilisées pour l'addition d'acide, de base, l'entrée du milieu (ou l'inoculation) et le soutirage de la culture, par l'intermédiaire de tubes en verre (ou de pipettes en verres de 2ml). Le système de prélèvement est installé en dérivation sur la sortie de milieu.
- Une entrée de 22 mm destinée à la sortie de l'effluent gazeux via un condenseur en verre connecté par un bouchon vissant.

Les lignes d'addition « acide et base » sont similaires à celles décrites précédemment. Les seules différences concernent la ligne d'entrée du milieu qui est composée de tuyau Masterflex de plus petit diamètre. Les bidons de milieu et les bidons de soutirage sont des bidons Nalgène de volume 5 l et 750 ml respectivement.

2.3. Conditions de culture et d'enrichissement

La première culture d'enrichissement est réalisée en 2 parties d'une durée de 26 et 22 jours (624h et 528h) respectivement. La première partie de la culture (F1) à 85°C, en présence de soufre élémentaire S° (soufre colloïdal à une concentration de 2 g/l). La deuxième partie de la culture (F2) a été réalisée à 60°C, en absence de soufre élémentaire après réinoculation. Les inoculations ont été réalisées par l'addition de 40 ml (2%) d'échantillon de cheminée EXO15E1. Lors des deux cultures successives le pH est maintenu à 6,5 et le balayage gazeux par N₂H₂CO₂ (75/20/5) à un débit de 400 ml. h⁻¹ (0,2 v.v.min⁻¹).

Pour les cultures F1 et F2, une période de batch initiale de 24 et 36 heures a précédé la culture en continu qui est ensuite établie par l'application d'un taux de dilution de 0,04 h⁻¹ équivalent à 80 ml.h⁻¹. Ce taux de dilution correspond à un temps de renouvellement total du milieu (i.e. passage de 3 fois 2 l de milieu) de 75 h.

Une troisième culture a été réalisée à bord du navire Océanographique Pourquoi pas ? lors de la campagne MoMARETO 2006. Cette culture d'une durée de 450h a été réalisée à 65°C à pH 6 avec un balayage gazeux par de l'azote avec un débit de 170 ml.h⁻¹ (0,2 v.v.min⁻¹). Après une période de batch de 27h, un taux de dilution de 0,04 h⁻¹ correspondant à un débit de milieu de 34 ml.h⁻¹ a été fixé. Les inoculations ont été réalisées par l'addition de 16 ml (2%) d'échantillon de cheminée.

2.3.1. Milieu de culture:

Fermentation 1 et 2

Le milieu de culture utilisé est un milieu complexe, à base d'eau de mer, contenant des sources organiques complexes (extrait de levure, acide casamique), des sucres, des sels minéraux ainsi que du soufre (Postec et al., 2005a; Postec et al., 2005b; Postec et al., 2007). C'est un milieu peu sélectif conçu pour cultiver un grand nombre de micro-organismes. Dans cette étude, la matière organique du milieu utilisée, est diluée au **1/100** par rapport aux concentrations décrites par Postec et coll ce qui correspond à une concentration totale en matière organique de 0,031g. L⁻¹.

Tableau 7 : Composition du milieu de culture

	Composants	(g ou mL). L⁻¹
Sources organiques complexes	extrait de levure (Difco)	0,01 g
	casaminoacides (Difco)	0,005 g
Sucres ¹	glucose	0,004 g
	dextrine	0,004 g
	D(+)-galactose	0,002 g
	dextrane	0,002 g
	glycogène	0,001 g
	pyruvate	0,002 g
	acétate	0,001 g
	Sels et minéraux	NaCl
	solution de sels de magnésium ²	10 mL
	solution A ³	1 mL
	solution B ⁴	1 mL
	solution C ⁵	1 mL
	solution D ⁶	1 mL
Vitamines	solution de vitamines ⁷	0,5 mL
Indicateur ⁸	solution de résazurine (1 mg mL ⁻¹)	0,5 mL
	Soufre ¹⁰	3 g

1 : Tous les sucres sont fournis par Sigma.

2 : Solution stock de sels de magnésium (par litre) : MgSO₄, 7 H₂O, 180 g et MgCl₂, 6 H₂O, 140 g.

3 : Solution A (par litre) : MnSO₄, 4 H₂O, 9 g; ZnSO₄, 7 H₂O, 2,5 g; NiCl₂, 6 H₂O, 2,5 g; AlK(SO₄)₂, 12 H₂O, 0,3 g; CoCl₂, 6 H₂O, 0,3 g et CuSO₄, 5 H₂O, 0,15 g.

4 : Solution B (par litre): CaCl₂, 2 H₂O, 56 g; NaBr, 25 g; KCl, 16 g; KI, 10 g et SrCl₂, 6 H₂O, 4 g.

5 : Solution C (par litre) : K₂HPO₄, 50 g; H₃BO₃, 7,5 g; Na₂WO₄, 2 H₂O, 3,3 g ; Na₂MoO₄, 2 H₂O, 0,15 g; et Na₂SeO₃, 0,005 g.

6 : Solution D (par litre): FeCl₂, 4 H₂O, 10 g dans une solution d'acide chlorhydrique 1M, qsp 1l.

7 : La composition de la solution de vitamines a été précédemment décrite (Sharp and Raven, 1997).

8 : La résazurine est un indicateur de l'état de réduction et permet de s'assurer visuellement du maintien des conditions d'anaérobiose : oxydée bleue → oxydée à 50% rose → réduite incolore. Cet indicateur s'utilise pour des pH compris entre 6 et 8.

Fermentation 3 :

Des prélèvements de fluide hydrothermal, dans des poches stériles de 5l grâce au préleveur d'eau PEPITO (Sarrazin et al., 2006) ont été réalisés plusieurs fois pendant la campagne dans la zone de mélange (température d'environ 150°C) sur la cheminée MO3E1 (utilisée comme inoculum).

A bord, le fluide prélevé a été filtré successivement sur filtre à 0,45µm (Millipore) et 0,22µm (Filtres autoclavables 0,22µm Sartobran, Sartorius, France) et conservé stérilement. Pour cette étude le fluide auquel ont été rajoutés les vitamines et les substrats carbonés (à une concentration 10X, correspond à une concentration totale en matière organique de 0,31g.l⁻¹) du milieu précédent a servi de milieu de culture.

Stérilisation des milieux :

Les milieux de cultures sont stérilisés par filtration (filtres autoclavables 0,22µm Sartobran, Sartorius, France) dans des bouteilles Nalgène de 5 l au préalable stérilisées (20 min à 121°C).

2.3.2. Suivi des cultures

Le suivi de la culture est réalisé tous les jours en relevant la température, le pH, le débit du milieu, le débit du mélange gazeux. Des prélèvements sont réalisés toutes les 36 à 48 heures. La concentration cellulaire de chaque échantillon a été déterminée par comptage direct des cellules en contraste de phase en utilisant une cellule de Thoma (0,02 mm de profondeur) et un microscope Olympus BX60 à contraste de phase (X400).

Conditionnement des échantillons

Les prélèvements sont conditionnés en fonction de leur utilisation :

- 2 x 15 ml de culture sont conditionnés en fiole pénicilline, balayés avec le mélange N₂H₂CO₂ (75/20/5) pour les cultures réalisées au laboratoire (F1 et F2) ou de l'azote pour la culture réalisée à bord (F3) afin de maintenir l'anaérobiose, puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation pour la réalisation de sous cultures.
- 3 x 15 ml de culture sont prélevés et centrifugés à 8000g pendant 30 minutes. Les culots cellulaires sont repris dans 5 ml d'une solution de lyse TE-Na 1X

(Tris HCl pH8, 100 mM ; EDTA pH8, 50 mM ; NaCl, 100mM). Les échantillons sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour l'extraction d'acides nucléiques.

- 12 ml de culture sont prélevés et fixés pendant deux heures en présence de formaldéhyde 3% (v/v). Le culot de cellules fixées est récupéré par une centrifugation de 10 min à 6000g, rincé avec du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) puis stocké dans un tampon PBS/éthanol v/v à -20°C. Ces échantillons seront utilisés lors d'hybridation sur cellules totales (Whole cell hybridization).

2.4. Techniques moléculaires d'étude de la diversité microbienne de l'échantillon de cheminée et des cultures d'enrichissement

2.4.1. Extraction de l'ADN total

Les extractions sont réalisées avec le kit FastDNA[®] (Qbiogene, Inc, CA) sur 500 µl d'échantillon. Plusieurs extractions sont parfois effectuées sur un même échantillon puis rassemblées et purifiées. Il s'agit d'une extraction standardisée par lyse mécanique des cellules donnant – dans nos conditions de manipulation – de meilleurs résultats que les protocoles d'extraction classiques utilisant le phénol-chloroforme-alcool isoamylique. Le protocole utilisé est celui défini et modifié par Webster, et Erwan Roussel (communication personnelle) afin d'optimiser l'extraction. Les modifications majeures correspondent à un ajout de 200 µg d'acide polyadénylique à la phase de préparation de l'échantillon, à l'augmentation du temps d'homogénéisation avec la « binding matrix » 25 minutes à la place de 2 minutes et un repos de 30 minutes à 37°C à la place de 3 minutes à température ambiante. De plus lors de l'élution de l'ADN extrait, l'eau DES est maintenue en contact avec le filtre contenant les acides nucléiques pendant 1 heure à 37°C au lieu de 3 minutes.

Les solutions d'ADN obtenues sont purifiées avec une unité Microcon YM-100[®] (Millipore, Inc) qui permet de concentrer et de dessaler les solutions de macromolécules. Pour certains échantillons dont la densité cellulaire avait été estimée comme faible, l'extraction est réalisée en duplicat, les solutions d'ADN obtenues sont rassemblées et concentrées sur les colonnes YM-100[®] (Millipore, Inc). Les concentrations d'ADN extrait sont mesurées à l'aide d'un Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific).

2.4.2. Amplification des gènes par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les gènes codant pour l'ARNr16S des *Archaea* et des *Bacteria* sont amplifiés suivant le protocole suivant :

Pour chaque réaction, le volume réactionnel de 25 µL contient : 5 µL de Tampon 5X, 2µL de MgCl₂ (Magnesium chloride) à 25 mM, 0,2 µL de chaque amorce (100 picoM), 0.12µL (Gotaq (Promega) à 5U/µL), 0.25 µL de dNTP (désoxynucléotides) à 10mM et 1 µL d'ADN cible (≈100 ng). Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 8.

Des PCR nichées (Nested-PCR) sont réalisées pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr16S des *Archaea* de certains échantillons, dans ce cas 1 µl du produit PCR obtenu après la première amplification est utilisé pour la PCR nichée.

Le cycle suivant est réalisé grâce au Thermocycler GeneAmp PCR System 9000 Applied

Biosystems:

3 min	94°C (dénaturation initiale)	
1 min	94°C (dénaturation)	} 30 cycles
1 min 30	49°C * (hybridation)	
2 min	72°C (élongation)	
6 min	72°C (élongation finale)	
Infini ∞	6°C (conservation)	

* La température d'hybridation appliquée dépend du couple d'amorces utilisé.

2.4.3. Clonage-Séquençage

Des banques de clones ont été construites en utilisant le kit PGEMT Easy Vector System I Promega à partir des ARNr16S amplifiés par PCR et obtenus à partir de l'échantillon brut de cheminée EXO15E1 et de 6 échantillons de chacune des deux cultures.

Le protocole du clonage à l'aide de ce kit est celui décrit par le fabricant.

- Sélection et analyse des clones :

La sélection des cellules possédant le plasmide recombiné se fait par la couleur des colonies. Lorsque le plasmide ne possède pas l'insert, le gène Lac Z n'est pas interrompu et la β-galactosidase est exprimée (par induction à l'IPTG). La β-galactosidase hydrolyse l'X-Gal ce qui génère un produit bleu. Lorsque l'insert est présent, le gène Lac Z est interrompu, il n'y a

pas de production de β -galactosidase dans ce cas et les colonies obtenues sont blanches. Les colonies blanches sont repiquées sur milieu + ampicilline pour conservation des clones.

- Vérification de la présence de l'insert :

Les colonies sont reprises dans 100 μ l d'eau Milli-Q stérile. Les fragments insérés sont amplifiés par PCR à l'aide des amorces M13R et M13F ($T_m=55^\circ\text{C}$). La taille de l'insert est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Le séquençage est effectué en microplaque de 96 puits, traités à la plate forme OUEST-Génopôle à Roscoff (<http://www.sb-roscoff.fr/SG/>). Les clones sont cultivés pendant 15 à 20 heures à 37°C sur microplaque deep-well de 96 puits, dans 1 ml de LB 2X (10g/L⁻¹ de tryptone, 5g/L⁻¹ d'extrait de levure, 10g/L⁻¹ de NaCl) contenant 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ d'ampicilline. Les plaques sont ensuite centrifugées à 4000rpm pendant 15 min. les culots cellulaires sont conservés à -20°C . Les plasmides sont extraits et purifiés en utilisant le kit Plasmid Miniprep (Millipore).

Le séquençage est réalisé grâce à un séquenceur automatique (Abi Prism 3100 GA, Applied Biosystem) à 16 capillaires.

2.4.4. Analyse phylogénétique

L'édition, l'alignement et l'analyse des séquences pour la construction d'un arbre phylogénétique sont réalisés avec les programmes suivants : BioEdit version 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), ClustalW (Thompson et al., 1994) et Phylo_Win (Galtier and Lobry, 1997). Les arbres sont construits avec la méthode du neighbor-joining. La valeur de « bootstrap » est calculée après l'analyse de 500 arbres.

2.4.5. Etude des communautés microbiennes par PCR quantitative

Cette technique est utilisée dans le but d'effectuer une quantification relative des *Archaea* et *Bacteria* au sein des deux cultures en bioréacteur. Les réactions de PCR quantitative sont effectuées dans un Thermocycleur Applied Biosystem 7300 System.

- Etablissement des courbes standard

Afin de quantifier les gènes cibles recherchés, des courbes standard sont générées à partir de dilutions au 1/10 de quantités d'ADN connues de 10^0 à 10^{-7} . Les ADN servant de standards

pour la PCR quantitative proviennent de cultures pures de *Thermococcus litoralis* pour l'établissement de la courbe standard des Archaea et du plasmide de *Deferribacter sp* pour les Bacteria (Tableau 8).

Pour chaque réaction, le volume réactionnel de 25 µl contient 12,5 µl de Absolute blue qPCR Rox mix (*ABgene*), 0,2 µl de chaque amorce (50µM), 1 µl de sonde Taqman (5µM) et 1 µl d'ADN (1-100 ng).

Programmes utilisés :

- Pour les Archea (Takai and Horikoshi, 2000b):
 - 2 min à 50°C
 - 15 min à 95°C (dénaturation initiale)
 - 25 sec à 95°C (dénaturation)
 - 60°C pendant 6 min (élongation)40 cycles
- Pour les Bacteria (Nadkarni et al., 2002):
 - 2 min à 50°C
 - 15 min à 95°C (dénaturation initiale)
 - 15 sec à 95°C (dénaturation)
 - 60°C pendant 1 min (élongation)40 cycles

Chaque échantillon est traité en duplicat voire en triplicat pour les témoins. La fluorescence est mesurée à chaque cycle, après l'étape d'élongation. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel 7000 System SDS Software (Applied Biosystem).

Les témoins ont permis d'établir une courbe standard à partir de laquelle est ensuite déterminée la quantité d'ADN dans chacun des échantillons analysés et la proportion relative des micro-organismes archéens et bactériens.

2.4.6. Etude des communautés microbiennes par SSCP

La SSCP est une technique appropriée pour effectuer des suivis de populations. Elle peut être employée en écologie microbienne pour analyser le polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simples brins, notamment l'ARNr16S, après amplification par PCR d'une région variable du gène. Ainsi la diversité microbienne d'un échantillon est représentée par un profil de pics ou chaque pic correspond à une séquence distincte. L'aire de chaque pic donne une estimation de l'abondance du micro-organisme correspondant dans l'échantillon (Godon et al., 2001; Leclerc et al., 2001; Chachkhiani et al., 2004).

Dans un premier temps, une PCR est réalisée dans un appareil GeneAmpPCR system9700 dans un volume réactionnel de 50 μ L contenant 5 μ L de tampon 10x *Pfu* Turbo (Stratagen), 4 μ L de dNTPs (2,5 mM), 1,3 μ L de chaque amorce (100 ng/ μ L), 0,5 μ L de *Pfu* Turbo à 2,5 U/ μ L (Stratagen), 36,9 μ L d'eau distillée stérile et 1 μ L d'ADN. La *Pfu* Turbo est une Taq polymérase permettant d'obtenir des fragments d'ADN à bouts francs et possédant un taux d'erreur faible ($1,6 \times 10^{-6}$ erreurs/base). Les amorces utilisées sont référencées dans le tableau 8.

Tableau 8: Liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de fragments d'ADNr16S archéens et bactériens en vue de l'étude de diversité (ADNr16S), de la PCR quantitative, de la SSCP et du clonage. S : amorce sens ; AS : amorce anti-sens.

		Amorces	Sens	séquences
16s ARNr	<i>Archaea</i>	A24F	S	5' CGG TTG ATC CTG CCG GA 3'
		A344F	S	5' AYG GGG YGC ASC AGG SG 3'
		A21F	S	5' TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA 3'
		A915R	AS	5' GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3'
		A958R	AS	5' YCC GGC GTT GAM TCC AAT T 3'
	<i>Bacteria</i>	E338F	S	5' ACT CTT ACG GGA GGC AGC 3'
		E8F	S	5' AGA GGT TGA TCA TGG CTC AG 3'
	Universelles	U1407R	AS	5' GAC GGG GGG TGW GTR CAA 3'
		U1492R	AS	5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3'
	PCR quantitative	<i>Archaea</i>	Arch349F	S
Arch806R			AS	5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'
Sonde TaqMan				5'-GYCAGCCGCCGCGGTAAHACCVGC-3'
<i>Bacteria</i>		331F	S	5'- TCCTACGGGAGGCAGCAGT -3'
		797R	AS	5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'
		Sonde Taqman		5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC -3'
Clones	Vecteur	M13F	S	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
		M13R	AS	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
SSCP	V3 ARNr16S <i>Bacteria</i>	W49F	S	5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3'
		W104R	AS	5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'
	V3 ARNr16S <i>Archaea</i>	W116F	S	5'-TCCAGGCCCTACGGGG-3'
		W104R	AS	5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'

Les produits d'amplification sont ensuite préparés pour l'analyse SSCP : 1 μ L de produit PCR est mélangé à 18,5 μ L de formamide pur (Applied biosystem) et 0,5 μ L d'étalon interne (marqueur de taille GeneScan-400 ROX, Applied biosystem). L'ADN est dénaturé par chauffage (5 minutes à 95°C) puis refroidi immédiatement (10 minutes dans de la glace fondante). Les différentes molécules d'ADN simple brin ainsi obtenues sont alors séparées par électrophorèse capillaire et détectées grâce au marquage des amorces.

L'électrophorèse est réalisée à l'aide d'un séquenceur automatique ABI PRISM 310 Applied (Applied Biosystem) équipé d'un capillaire de 47cm x 50 μ m, rempli de polymère composé de

5,6% de GeneScan polymère (Applied Biosystem), 10% de glycérol (Sigma) et du TBE 1X. Les conditions de migration sont les suivantes : 12kV et 32°C pendant 30 minutes par échantillon. Le calage des migrations en fonction du marqueur de taille est réalisé par le logiciel GeneScan® version 3.1.

Les profils obtenus sont ensuite analysés avec le logiciel Safum 2.0 (Statistical Analysis of Fingerprinting Using Matlab) (Loisel et al., 2006; Zemb et al., 2007). Afin d'identifier les pics d'intérêt, des clones « connus » sont également amplifiés par PCR-SSCP et analysés dans les mêmes conditions. Les pics obtenus sont donc comparés aux pics obtenus dans les communautés microbiennes.

2.5. Sous-culture et isolements

Des sous-cultures sont réalisées en flacons afin de tenter d'isoler des micro-organismes détectés dans les cultures d'enrichissement. Le milieu d'enrichissement est celui utilisé lors des cultures en bioréacteur. Cependant, au cours des différents essais le milieu a pu être modifié afin de cibler la culture de certains micro-organismes. Les modifications du milieu sont précisées de manière appropriée dans les chapitres « résultats ». Les prélèvements réalisés lors des cultures d'enrichissement et conservés à 4°C ont servi d'inoculum pour ces cultures.

2.5.1. Isolement par séries de dilutions

Des séries de dilutions ont été effectuées en inoculant 9 ml de milieu en tube Hungate avec 1ml de culture d'enrichissement. Dix dilutions successives au 10^{ème} ont été réalisées. La dernière dilution pour laquelle une culture positive est observée, sert d'inoculum pour la deuxième série de dilutions. En moyenne, trois ou quatre séries de dilutions successives sont effectuées pour l'isolement de chacune des souches.

2.5.2. Isolement par étalement sur boîtes (pour les Thermococcales)

Dans ce cas le milieu de culture est additionné d'un agent gélifiant, le Phytigel à 1,5% (Sigma) pour des cultures en condition thermophile. Le pouvoir gélifiant du Phytigel se maintient à des températures élevées (100°C contre 65°C pour l'agar classique). Par ailleurs, le protocole de culture en milieu solide de micro-organismes thermophiles sulfures réducteurs

est celui publié par Erauso et *al.* en 1995 (Erauso et al., 1995). Il consiste à couler une première couche de milieu acide (15 g.l⁻¹ de gelrite, 23 g.l⁻¹ de NaCl, 20 ml.l⁻¹ d'acide chlorhydrique 0,1 M), puis sur cette couche durcie, à couler le milieu de culture additionné de 15 g.l⁻¹ de gelrite et de 2 ml.l⁻¹ d'une solution de polysulfures. Les polysulfures servent de sources de soufre et d'agents réducteurs. Ils précipitent au contact de la couche acide en fines particules de soufre élémentaire. Cette opération permet de réduire en grande partie le milieu qui est par ailleurs coulé chaud. Les boîtes refroidies sont ensuite transférées dans l'enceinte anaérobie pour être inoculées et placées dans des bocaux en verre contenant du dessiccateur de type silicagel pour piéger l'humidité. Puis ils sont incubés dans les étuves aux températures désirées.

2.5.3. Préparation de la solution d'oxyde de Fer (poorly crystalline Fe (III) oxide) utilisée pour l'isolement de la souche affiliée à *Geoglobus ahangari*

Une étudiante de Master 1 Mathilde Le Roy (Université de Bretagne Occidentale) a effectué un stage de deux mois au sein du laboratoire de Jim Holden à l'Université du Massachusetts. Ce laboratoire maîtrise les techniques de culture de micro-organismes feroreducteurs et notamment la préparation de la solution d'oxyde de Fe (III).

Pour réaliser la solution de Fer (III), 59,4 g de FeCl₃ sont pesés et ajoutés à 550 ml d'eau distillée. 50 ml de cette solution sont réservés et sont utilisés si nécessaire pour réajuster le pH. Le pH est ajusté à 7 à l'aide d'une solution de NaOH.6N. Le pH de la solution de départ est d'environ 1. Durant toute la préparation, le pH-mètre doit être régulièrement rincé avec de l'eau distillée et la solution de NaOH doit être ajoutée très lentement. Le pH joue un rôle très important dans la réussite de la solution car un pH de 7 correspond à la valeur optimale de croissance des micro-organismes ciblés dans cette étude. Si le pH dépasse 7, il est ajusté à l'aide de la solution de FeCl₃ mise de côté en début de manipulation. Le pH stabilisé, la même quantité de solution est placée dans 4 bouteilles de centrifugation remplies aux deux-tiers, puis centrifugées à 5000g pendant 20 min. Le surnageant est éliminé. Le culot pâteux et marron est remis en suspension avec de l'eau distillée afin de remplir les bouteilles aux deux-tiers. La solution est de nouveau centrifugée dans les mêmes conditions. Le nombre de centrifugations nécessaires peut être variable (3 à 4 en général). Après la dernière centrifugation, le surnageant apparaît plus jaune et plus sale que précédemment. Des petites taches noires sont également présentes à la surface de la pâte, qui est elle collante et rouge. Si une centrifugation de trop est réalisée, d'importantes tâches noires peuvent apparaître à la

surface du culot et la solution est alors à refaire. Durant la dernière étape, les culots sont rassemblés et de l'eau distillée est ajoutée afin de remplir la bouteille aux quatre cinquièmes environ. La solution est mise à agiter pendant une heure puis conservée à l'abri de la lumière à 4°C.

Résultats

Partie 1 : Recherche de micro-organismes anammox dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds

1. Introduction

Dans les océans le processus de dénitrification conduit à la transformation du nitrate en dinitrogène gazeux (N_2) et donc à une perte d'azote. Cette réaction qui se produit lors de la décomposition de la matière organique est assurée par des micro-organismes en situation d'anoxie. Le dinitrogène N_2 peut être également produit grâce à l'oxydation anaérobie de l'ammonium dans la colonne d'eau océanique (Dalsgaard et al., 2003; Kuypers et al., 2003; Kuypers et al., 2005). En effet, il a été récemment mis en évidence que l'oxydation anaérobie de l'ammonium était effectuée par des bactéries appartenant aux phylums des Planctomycètes (Strous et al., 1999b). Celles-ci seraient responsables d'une fraction significative de la production de dinitrogène (N_2) au niveau des sédiments marins (Thamdrup and Dalsgaard, 2002; Dalsgaard et al., 2003). De plus des Planctomycètes possédant le métabolisme anammox ont été retrouvés dans de nombreux écosystèmes géographiquement et écologiquement différents (Schmid et al., 2007).

Les écosystèmes hydrothermaux sont caractérisés par des gradients physiques (température, pH) et chimiques (concentration en composés chimiques) abrupts qui correspondent au mélange entre l'eau de mer et le fluide hydrothermal ; dans ces gradients les variations de température sont plus ou moins corrélées aux transitions entre anaérobiose et aérobie.

Les approches culturelles réalisées depuis une trentaine d'années ont abouti à l'isolement et à la description de nombreuses et nouvelles espèces de procaryotes issues de cet écosystème. Nombre de ces espèces sont des espèces thermophiles et hyperthermophiles isolées des édifices hydrothermaux actifs qui appartiennent aux deux domaines *Archaea* et *Bacteria*.

Dans la synthèse bibliographique nous avons vu que l'oxydation aérobie de l'ammonium ou nitrification a été démontrée par l'enrichissement des micro-organismes nitrifiants hétérotrophes thermophiles (Mével and Prieur, 1998; Mével and Prieur, 2000) à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales mais malgré de nombreuses tentatives aucun n'avait pu être isolé. La détection de gènes *nif H* (Mehta et al., 2003; Mehta and Baross, 2006), ainsi que l'isolement d'une *Methanoarchaea* capable de fixer l'azote à 92°C (Mehta and Baross, 2006) suggèrent l'existence d'une fixation de l'azote dans l'écosystème hydrothermal. En ce qui concerne la dénitrification à haute température de nombreux micro-organismes ont été isolés et sont capables de cette réaction. Des nitrates, des nitrites et de l'ammonium ont été détectés dans cet environnement et ce le long du gradient de température (Sarradin et al., 1999). La présence de ces composés associés à l'alternance de conditions aérobies et anaérobies semble donc favorable à la présence de micro-organismes impliqués

dans le métabolisme anammox. Les travaux réalisés au cours de cette étude ont donc porté sur la recherche de ces micro-organismes et la mesure de leur activité. Dans un premier temps ces travaux ont été axés sur l'utilisation de techniques moléculaires afin de rechercher la présence de micro-organismes anammox (amplification du gène codant pour l'ARNr16s en utilisant des amorces spécifiques des bactéries anammox, clonage, séquençage, et hybridation in situ). La recherche des bactéries Anammox n'a pas seulement été réalisée dans la partie chaude de l'écosystème hydrothermal mais le long du gradient de température. Pour cela différents types d'échantillons ont été prélevés et analysés. Ces échantillons sont : des animaux (modioles et crevettes), des tapis microbiens et des édifices hydrothermaux actifs.

Les mesures d'activité Anammox utilisant des isotopes stables ont ensuite été effectuées et ce uniquement sur les échantillons «chauds» de l'écosystème (édifices hydrothermaux actifs), conservés à 4°C jusqu'à analyse en laboratoire. Les échantillons organiques (animaux et tapis microbiens) ne pouvant être conservés dans ces conditions, n'ont pu être analysés.

Tous ces travaux ont été effectués en étroite collaboration avec des chercheurs du Laboratoire « Institute of Wetland and Water Ecology » à Nijmegen, aux Pays-Bas.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux sont présentés et discutés dans un article publié dans ISME Journal, à la suite duquel sont exposés des résultats complémentaires.

2. Résultats

Article publié dans ISME Journal 31 July 2008; doi:10.1038/ismej.2008.72:

Nathalie Byrne, Marc Strous, Valentin Crépeau, Boran Kartal, Jean-Louis Birrien, Markus Schmid, Françoise Lesongeur, Stefan Schouten, Andrea Jaeschke, Mike Jetten, Daniel Prieur and Anne Godfroy. **“Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents”**.

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, ladderanes 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 advance online publication, 31 July 2008; doi:10.1038/ismej.2008.72

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

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 Nautille. 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'-AAACCCCTACTTAGTG 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-

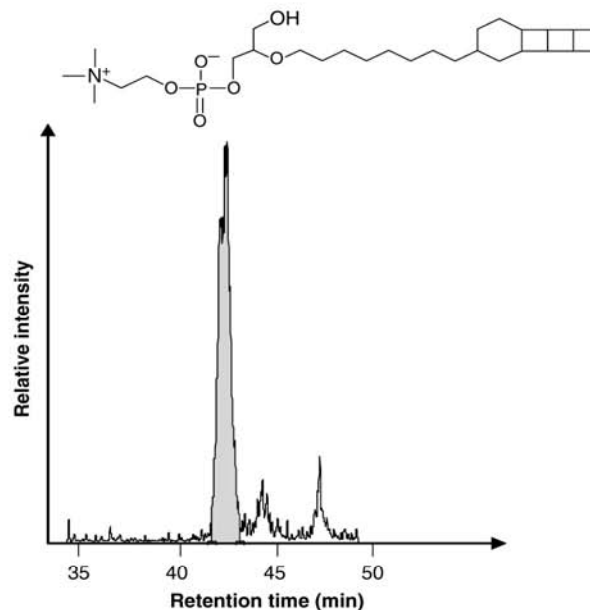


Figure 1 Selective reaction monitoring trace of the intact ladderane monoalkylether lipid with phosphocholine headgroup obtained by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the total-lipid extract of chimney 6 sample and the corresponding structure.

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 μ M) and $^{15}NO_2^-$ (final concentration 20 μ M) at temperatures of 30, 60 and 85 °C. Three gas analyses were performed after 20, 44 and 68 h incubation. For each measurement, 500 μ l 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 μ M), nitrite (0–2 μ M), 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 (Rattray *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

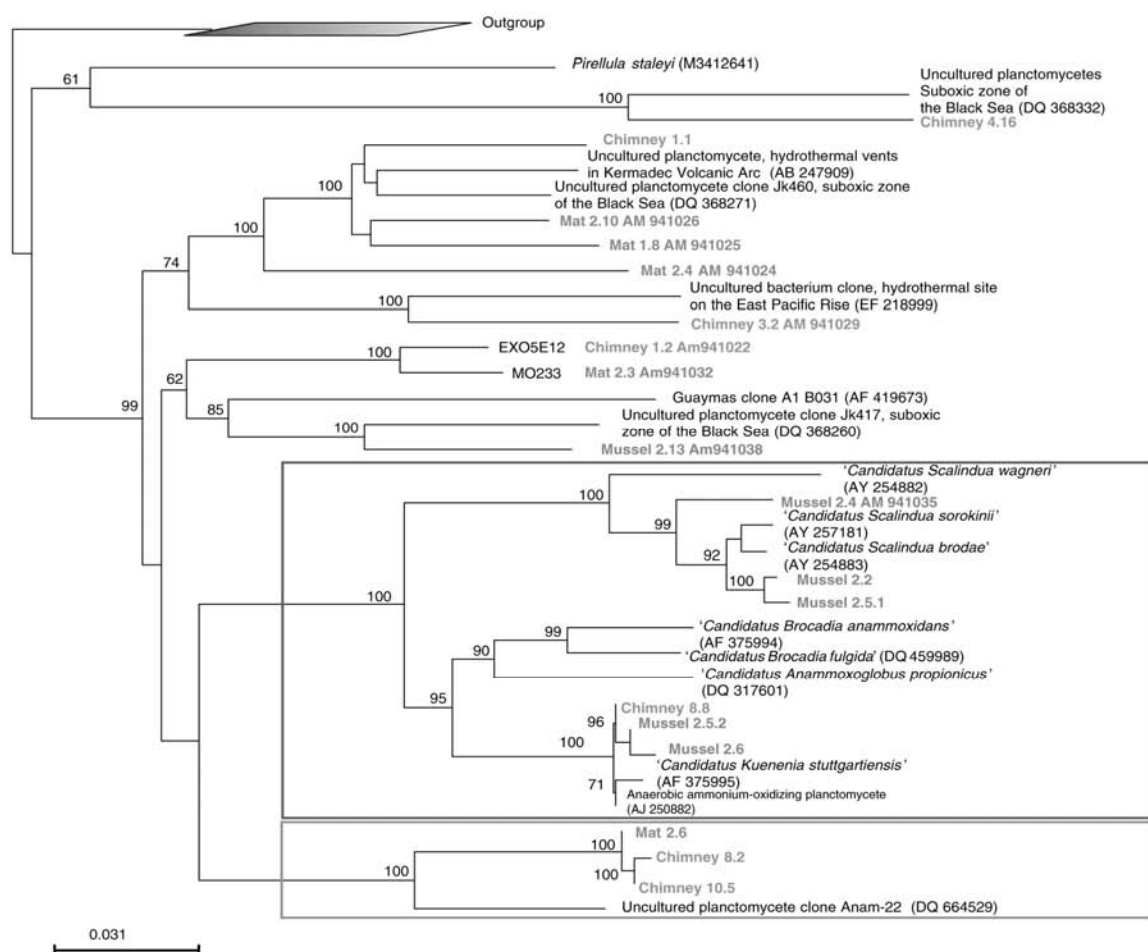


Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences determined by neighbor-joining analysis. The out group used was Gemmata sp and Isosphaera sp. The numbers at the nodes are the bootstrap values (in percentage). Bootstrap values above 50% are displayed. Scale bar indicates the expected number of changes 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 Nautile team. We also thank Jelle Eygenstein (Radboud University Nijmegen) for his help with the isotope ratio mass spectrometer; Katharina Ettwig 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, Raguenes G *et al.* (2002a). *Caminibacter hydrogenophilus* 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 ladderane 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 Interridge 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.

3. Résultats complémentaires

3.1. Recherche de micro-organismes anammox dans les échantillons hydrothermaux par Hybridation Fluorescente *in situ* (FISH)

L'hybridation fluorescente *in situ* a été utilisée pour visualiser les *Planctomyces* anammox éventuellement présents dans les échantillons, l'approche retenue ici est qualitative et non quantitative.

3.1.1. Comparaison des protocoles de préparation des échantillons.

L'utilisation des techniques de FISH sur des échantillons naturels se heurte à plusieurs difficultés. Dans le cas des échantillons de cheminées hydrothermales on peut noter la présence de particules minérales, ainsi que la faible concentration de cellules d'intérêt dans le milieu. Différentes étapes visant à diminuer les interactions entre particules minérales et micro-organismes ont donc été ajoutées à l'étape de fixation, testées et comparées avant la réalisation du protocole d'hybridation proprement dit. (cf. Matériel et méthodes).

Au regard des hybridations réalisées sur des échantillons sans préparation il apparaît qu'une étape de centrifugation est indispensable afin d'éliminer les particules minérales (Figure 25, A et B). Ces dernières sont responsables d'une hybridation non spécifique des sondes masquant les cellules et interdisant toute interprétation. Le traitement des lames à l'EDTA (un chélateur de cations) se montrant peu efficace, il est nécessaire d'éliminer ces particules minérales avant l'hybridation.

La sonication apparaît donc comme une solution intéressante pour libérer les cellules fixées aux particules minérales avant l'étape de centrifugation. Concentrer et rassembler les surnageants après plusieurs centrifugations permet d'augmenter efficacement le nombre – et probablement la diversité – des cellules présentes. Ce type d'approche déjà utilisé sur ce type d'échantillon (Chevaldonné and Godfroy, 1997; Harmsen et al., 1997) a été retenue pour cette étude.

Le problème de l'excès de particules minérales n'est pas rencontré avec les échantillons animaux (crevettes et moules). Néanmoins le traitement par sonication associé au rassemblement et à la concentration des surnageants apparaît comme intéressant pour augmenter le nombre de cellules et améliorer leur visibilité.

3.1.2. Principaux résultats obtenus :

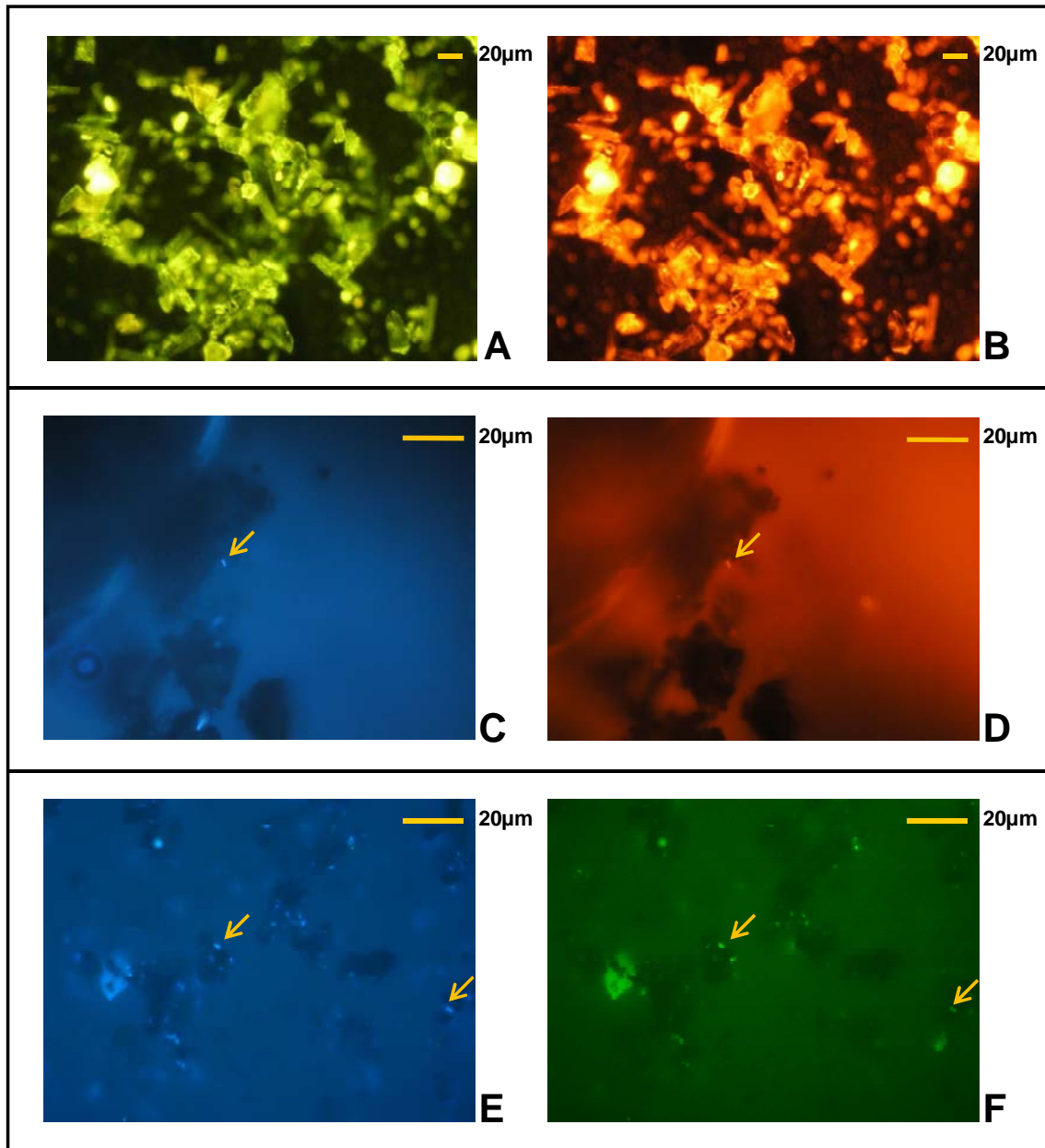


Figure 25 : Hybridation fluorescente in situ et coloration au DAPI de divers échantillons.

A et B : échantillon EXO17E1 sans prétraitement ; sondes S-S-Kst-0157-a-A-18 (A) et S*-Kst-1275-a-A-20 (B) ; Gx400.

C et D : échantillon MO8E1 avec sonication et centrifugation avec un gradient de densité au Percoll ; coloration au DAPI (C) et sonde S*-Kst-1275-a-A-20 (D) ; Gx1000.

E et F : échantillon MO8E1 avec sonication, centrifugation et concentration des surnageants ; coloration au DAPI (E) et sonde S*-Scabr-1114-a-A-22; Gx1000.

Les cellules d'intérêts sont désignées par des flèches.

Dans l'échantillon MO8E1 (chimney 8 dans l'article) quelques cellules sont fluorescentes à la fois avec la coloration au DAPI et avec des sondes spécifiques des genres *Kuenenia* et *Scalindua*. Il pourrait donc s'agir de bactéries anammox. Néanmoins de nombreuses hybridations non spécifiques des amorces empêchent de définir précisément leur nature (Figure 25. C, D, E et F). Le faible nombre de ces cellules peut indiquer – outre les difficultés de réalisation de l'hybridation spécifique – la faible concentration de micro-organismes anammox dans les échantillons.

3.2. Mesures de l'activité Anammox : Principaux problèmes rencontrés et adaptation du protocole aux échantillons hydrothermaux.

Au cours de ces deux années de travaux sur la mise en évidence du métabolisme anammox, un certain nombre de problèmes ont été rencontrés, en particulier en ce qui concerne les mesures d'activités.

Les mesures d'activités du métabolisme anammox sont réalisées par incorporation d'isotopes stables et sont un complément indispensable des techniques de biologie moléculaire, qui nous renseignent sur la présence et l'identité d'organismes anammox mais pas sur leur activité. La réaction anammox utilise comme substrats des molécules de nitrites et d'ammonium et aboutit à la formation de diazote gazeux (N_2). Cette molécule de diazote est composée d'un atome d'azote provenant de la molécule de nitrite et d'un atome d'azote provenant de la molécule d'ammonium. Si l'un des substrats de la réaction ici le nitrite possède un atome d'azote marqué (^{15}N), la réaction aboutit à la formation de diazote de masse atomique 29 ($^{29}N_2$). La mesure par spectrométrie de masse des proportions des différents isotopes de l'azote dans la phase gazeuse de l'échantillon permet donc de mettre en évidence l'activité anammox.

Les mesures d'activités ont été effectuées dans le laboratoire aux Pays-Bas en adaptant le protocole de Kuypers et al. (Kuypers et al., 2003). Une des phases importantes de préparation des échantillons au préalable des mesures d'activités est le maintien total de l'anaérobiose. En effet, toute contamination par de l'air et donc par de l'azote entraîne une augmentation de la proportion de $^{28}N_2$ dans le mélange réactionnel, donc une dilution du diazote marqué. Il est donc important de maintenir ou recréer une atmosphère anaérobie en utilisant un gaz inerte tel que l'argon ou l'hélium.

Le deuxième point important concerne la conservation des échantillons, le conditionnement, l'ajout des isotopes et les phases d'incubation avec les isotopes. L'ajout des isotopes et les incubations ont été dans un premier temps effectués à bord lors des campagnes océanographiques. Ces incubations réalisées dans des tubes Hungate (*Hungate*, Inc) de 15ml

fermés avec des bouchons septum épais contenant 5ml d'échantillon comportent donc une phase gazeuse importante de 10ml. Les tubes contenant les échantillons sont ensuite conservés à l'envers afin de limiter au maximum tout contact entre la phase gazeuse du tube et l'atmosphère extérieure. Après les premières expériences nous nous sommes rendus compte que les tubes n'étaient pas complètement étanches, il y avait donc eu une contamination par de l'air atmosphérique. Les mesures ont tout de même été effectuées, la présence de $^{28}\text{N}_2$ à une concentration trop importante a confirmé la contamination par de l'air atmosphérique et a empêché la mise en évidence d'une production de $^{29}\text{N}_2$,

Lors des phases d'expérimentations suivantes, les échantillons prélevés ont été conservés en anaérobiose sous atmosphère inerte (hélium) à bord et les étapes de conditionnement, d'ajout des isotopes, d'incubation (à différentes températures) et de mesures ont été effectuées directement au laboratoire aux Pays-Bas.

De plus suite aux premiers résultats obtenus par hybridation fluorescente *in situ* et lors des premières mesures d'activité, nous avons pu émettre l'hypothèse que le nombre de cellules anammox par échantillons était faible. Du fait de la faible densité cellulaire estimée, la production de diazote $^{29}\text{N}_2$, proportionnelle au nombre de cellules, est donc supposée être faible. Le type de tube a donc été modifié de façon à diminuer le volume de la phase gazeuse et ainsi concentrer au maximum les gaz produits dont le $^{29}\text{N}_2$. Les mesures ont été effectuées dans des tubes Exetainer® de 11ml avec 10ml d'échantillon et 1ml de phase gazeuse.

En parallèle, des tests de sensibilité du spectromètre de masse ont été effectués afin de déterminer la limite de détection de l'appareil pour les mesures de diazote 28, 29 et 30. Les tests ont été effectués en utilisant une culture de *Candidatus* « *Kuenenia stuttgartiensis* » en effectuant des séries de dilution jusqu'à 10^{-6} ce qui correspondait approximativement à 100 cellules.ml⁻¹. Une production de $^{29}\text{N}_2$ a pu être mesurée pour cette concentration cellulaire, ce qui a permis d'utiliser l'appareil tel qu'il était paramétré.

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 de la publication et sont exprimés en μM par jour.

Remarque : A partir des données brutes obtenues nous avons donc pu déterminer la production de $^{29}\text{N}_2$ pour chaque échantillon et par 24 heures. Nous avons lors de ces essais, également déterminé par « extrapolation » le nombre de cellules anammox actives présentes dans chaque échantillon environnemental. Pour cela, la concentration de $^{29}\text{N}_2$ produit par les échantillons témoins de *Candidatus* *Kuenenia stuttgartiensis* (utilisée comme témoin lors de ces mesures) a été déterminée. Par ailleurs, nous connaissions la densité cellulaire de l'échantillon de *Candidatus* *Kuenenia stuttgartiensis* utilisé lors des mesures d'activités. Nous

avons donc pu déterminer la production de $^{29}\text{N}_2$ par une cellule. Considérant que les bactéries anammox présentes dans nos échantillons produisaient la même quantité de $^{29}\text{N}_2$ que les cellules de *Candidatus* *Kuenenia stuttgartiensis*, il a été possible de déterminer la densité de cellules anammox dans chaque échantillon.

L'ensemble des travaux réalisés montre la présence d'organismes anammox dans plusieurs échantillons provenant de différents sites hydrothermaux profonds. De nombreux clones ont été obtenus à partir d'échantillons de tapis microbiens, de branchies de modioles mais aussi de fragments d'édifices hydrothermaux. Ces échantillons de cheminées venant des sites de Lucky Strike, Lost City et Rainbow – présentaient parfois des températures élevées –. La grande diversité des séquences obtenues permet de supposer qu'il existe dans l'écosystème hydrothermal de nouveaux genres ou espèces de *Planctomycetes* anammox. Les résultats des mesures d'activités ont indiqué que les micro-organismes anammox détectés dans les édifices hydrothermaux chauds étaient actifs à 30°C pour l'échantillon EXO13E1 ; à des températures plus proches des températures *in situ* : 60°C pour EXO14E1 et MOM07 et 85°C pour EXO17E1 et MOM07.

Les résultats obtenus par hybridation fluorescente *in situ*, malgré la détection de signal positif sur 1 échantillon de cheminée, sont peu concluants. Les difficultés de réalisation de cette technique sur des échantillons naturels empêchent de l'utiliser comme un moyen fiable de détection des organismes anammox pour ce type d'échantillon environnemental.

Il serait intéressant par la suite d'élargir l'inventaire moléculaire à un plus grand nombre d'échantillons de natures et de lieux de prélèvement variés. A partir de ces premiers résultats le design d'amorces spécifiques aux bactéries anammox du clade B (figure 2) constituerait la prochaine étape et permettrait de détecter spécifiquement une partie des bactéries anammox de l'écosystème hydrothermal. De plus, nous avons montré que l'utilisation d'amorces « anammox » spécifique est nécessaire. En effet les amorces *Bacteria* universelles ne permettent pas de mettre en évidence les bactéries anammox. Par exemple dans une étude de diversité des micro-organismes des tapis microbiens, les amorces *Bacteria* avaient permis de détecter des *Planctomycetes* mais pas les bactéries anammox qui ont été détectées ultérieurement en utilisant des amorces spécifiques (Randrianalivelo et al., 2006; Crepeau, 2007).

Le dernier objectif serait d'accéder à la diversité de ces micro-organismes par le biais de cultures d'enrichissement en fermenteur. La mise au point d'une approche culturelle

permettrait d'isoler les nouveaux genres et espèces seulement entrevus par les méthodes de biologie moléculaire. Les cultures d'enrichissement de bactéries anammox seront effectuées en utilisant des bioréacteurs. Le milieu de culture supplémenté en nitrite, nitrate et ammonium de l'ammonium sera ajouté en continu dans le bioréacteur. Des prélèvements de la culture seront effectués régulièrement afin de mesurer dans un premier temps les concentrations en nitrites, nitrates et ammonium consommés ou non par les micro-organismes dans la culture (Mulder et al., 1995; van de Graaf et al., 1995). Des essais de culture d'enrichissement à haute température seront effectués au laboratoire en utilisant le bioréacteur gas-lift et l'échantillon MOM07 du site Rainbow pour lequel les données moléculaires et les mesures d'activités sont positives. En parallèle des essais de culture d'enrichissement seraient effectués au sein du laboratoire aux Pays-Bas qui maîtrise la culture de bactéries anammox. Le développement de sondes pour le FISH, le design d'amorces permettrait de faire un suivi moléculaire des enrichissements.

La mise en évidence du métabolisme anammox dans les écosystèmes hydrothermaux devrait permettre à terme de préciser le déroulement du cycle de l'azote dont la connaissance est, pour ces milieux, partielle.

Partie 2 : Diversité métabolique des
micro-organismes des édifices
hydrothermaux actifs : approches
culturelles en bioréacteur

Etude 1 : Etude de l'effet des variations des conditions de l'environnement sur les communautés microbiennes de cheminées hydrothermales cultivées en bioréacteur.

1. Introduction

L'identification des populations microbiennes constituant les communautés reste difficile à effectuer. De plus, il a été estimé à plus de 90%, le pourcentage de micro-organismes encore incultivés (Amann et al., 1995) et ceci dans de nombreux écosystèmes. Dans l'écosystème hydrothermal les approches moléculaires ont montré l'étendue de la diversité microbienne (Takai et al., 2001; Alain et al., 2002c; Nercessian et al., 2003; Page et al., 2004; Schrenk et al., 2004). Les approches culturales restent toutefois nécessaires afin de décrire de nouveaux micro-organismes notamment au niveau des sources hydrothermales. Cependant les cultures traditionnelles en flacons permettent rarement de se rapprocher des conditions environnementales. Les techniques de culture classiques sont souvent sélectives fournissant alors une image restreinte de la diversité microbienne d'un écosystème. Certaines études décrivent l'isolement de micro-organismes nouveaux à partir d'échantillons environnementaux dont l'inventaire moléculaire n'avait pas permis la détection (Gonzalez-Toril et al., 2003; Alain et al., 2004; Postec et al., 2005b; Postec et al., 2007). Il apparaît alors clairement qu'aucune des deux approches : culturale et moléculaire ne permet d'élucider seule les questions d'écologie microbienne concernant la biodiversité, le fonctionnement et la dynamique des communautés.

L'utilisation de nouvelles techniques de culture permettant de mieux appréhender les conditions environnementales des habitats naturels apparaît alors comme une alternative prometteuse.

Un système de fermentation – bioréacteur gas-lift - a été mis au point dans un premier temps pour la culture, en absence de soufre, de micro-organismes hyperthermophiles soufre réducteurs de l'ordre des *Thermococcales* (Raven et al., 1992). Cet outil a été utilisé pour l'obtention de concentrations cellulaires importantes, la mise au point d'un milieu de culture minimum pour la culture de *Pyrococcus furiosus* (Raven and Sharp, 1997), l'étude physiologique de *Pyrococcus abyssi* (Godfroy et al., 2000) ainsi que l'optimisation des conditions de culture et la mise au point d'un milieu minimum pour *Thermococcus hydrothermalis* (Postec et al., 2005a).

Par la suite, le bioréacteur gas-lift a été utilisé pour réaliser des cultures d'enrichissement en continu à haute température à partir d'échantillons de cheminée hydrothermale et ce parallèlement à des cultures en batch (Postec et al., 2005b; Postec et al., 2007).

Ces travaux ont permis dans un premier temps d'obtenir en culture à 90°C, sur plusieurs semaines, des populations microbiennes hétérotrophes anaérobies hyperthermophiles. La structure de la communauté cultivée a été étudiée grâce à une analyse moléculaire (amplification des gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S, séparation par DGGE ou clonage, puis séquençage). L'ensemble des résultats de DGGE et de séquençage ont confirmé l'intérêt de la culture d'enrichissement en fermenteur puisqu'il a été possible de cultiver :

- des espèces très minoritaires de l'échantillon initial
- des espèces non décrites et non cultivées jusqu'alors (*epsilon-Proteobacteria*),
- des espèces se développant dans des conditions inattendues.
- et de mettre en évidence l'existence d'une dynamique au sein des populations cultivées.

La diversité obtenue grâce à ce type de culture a été comparée avec celle obtenue dans une culture d'enrichissement réalisée en batch (en flacon) sur le même milieu de culture. Les résultats obtenus mettent en évidence une diversité très faible puisque limitée aux seules *Thermococcales* et a ainsi montré clairement les potentialités de la culture en continu pour accéder à une plus grande diversité.

L'efficacité de cette approche a été confirmée par la réalisation d'une deuxième culture dans les mêmes conditions à l'exception de la température qui a été abaissée à 60°C. La température choisie correspondait au *preferendum* thermique des espèces bactériennes thermophiles (*Marinitoga* sp. et *Caminiella* sp.) mises en évidence dans la culture à 90°C et représente d'autre part une température basse pour la croissance des *Thermococcales*, notamment les espèces du genre *Pyrococcus* identifiées comme étant dominantes dans la culture d'enrichissement précédente.

Les résultats obtenus ont mis en évidence une diversité cultivée différente de celle observée à 90°C. Bien que des espèces du genre *Thermococcus* aient été détectées dans la culture d'enrichissement, la diversité était caractérisée par la présence d'espèces thermophiles, appartenant à l'ordre des *Thermotogales*, différentes de celles obtenues à 90°C. D'autres espèces appartenant à l'ordre des *Clostridiales* avec des représentants du genre *Caminiella* ont été mises en évidence. De plus des espèces autotrophes ou du moins mixotrophes, avec des représentants du genre *Deferribacter* et du genre *Thermodesulfator*, ont été détectées. Cette culture en continu a également permis de sous-cultiver en batch lors de culture en flacon

la majeure partie des espèces mises en évidence par l'analyse moléculaire et de les isoler. Parmi les souches isolées deux nouvelles espèces ont été décrites: *Marinitoga hydrogenitolerans* (Postec et al., 2005c) et *Thermodesulfatator atlanticus* (Alain et al., soumis).

Ainsi ces travaux ont montré qu'il était possible de maintenir en culture sur une durée longue une fraction des communautés thermophiles et hyperthermophiles des édifices hydrothermaux actifs en sachant que les conditions de culture de départ conditionnent la nature des communautés cultivées. Ces cultures de communautés permettent notamment d'accéder à de nouveaux micro-organismes et de les isoler mais également de mettre en évidence les interactions entre espèces.

Dans une étude récente, un bioréacteur a été utilisé pour effectuer des cultures d'enrichissement de micro-organismes à partir d'un échantillon prélevé sur la dorsale Est Pacifique. La culture a été réalisée sous pression (250 atm) à 70°C puis 90°C dans un milieu enrichi en nitrates et en sulfates. Les données obtenues ont montré un changement dans la dominance des populations microbiennes avec dans un premier temps des *Epsilon Protéobactéries* puis des *Aquificales* dans le milieu contenant des nitrates et des *Thermodesulfobactérales* dans le milieu avec sulfates. Ces travaux ont également permis d'étudier l'influence des communautés cultivées sur les minéraux (Houghton et al., 2007).

La possibilité de maintenir en culture sur une longue durée, une fraction des populations microbiennes thermophiles et hyperthermophiles hydrothermales, devrait ainsi permettre d'évaluer *in vitro* l'influence des variations de certains paramètres de l'habitat sur les populations microbiennes cultivables. Ces paramètres choisis afin de mimer au mieux les conditions existant *in situ* sont:

- 1 - la concentration en matière organique qui sera abaissée par rapport aux cultures précédemment réalisées afin de se placer en conditions oligotrophes. Peu d'études ont porté sur la détermination de la quantité de matière organique au niveau d'un édifice hydrothermal (Comita and Gagosian, 1983; Brault, 1984), Cependant l'apport de matière organique varie d'un site à l'autre et est fonction entre autre de la biomasse présente au niveau des sites hydrothermaux. La présence d'organismes autour des cheminées va avoir des effets directs sur la concentration en matière organique présente dans l'eau environnante notamment par l'apport des mécanismes d'excrétion des animaux. Cet apport de matière organique conditionne sûrement pour une grande part la nature et la quantité des micro-organismes présents au niveau des cheminées hydrothermales,

2 - la nature des donneurs et des accepteurs d'électrons présents dans la zone de mélanges entre les fluides hydrothermaux et l'eau de mer. Outre les éléments présents dans l'eau de mer, l'addition de H₂ et CO₂ dans le mélange gazeux ainsi que l'addition ou non de S⁰ sera testé. Ainsi les conditions de culture ont été choisies de façon à se rapprocher des conditions de l'environnement (faible concentration en matière organique et présence de H₂/CO₂) et d'étudier l'influence des variations environnementales sur les communautés cultivées (température et absence ou présence de S⁰).

2. Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor

Nathalie Byrne*, Françoise Lesongeur, Nadège Bienvenu, Claire Geslin, Karine Alain, Daniel Prieur and Anne Godfroy.

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR6197 IFREMER – Centre de Brest- BP70 / IUEM- Place Nicolas Copernic- 29280 PLOUZANE, France

* Corresponding author : Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR6197 IFREMER – Centre de Brest- BP70 29280 PLOUZANE, FRANCE

Phone : 00 33 (0)2 98 22 46 74

E-mail: nathalie.byrne@gmail.com

Under revision

Abstract

Both cultivation and molecular techniques were used to investigate the microbial diversity and dynamic of a deep sea vent chimney. The enrichment cultures performed in a gas lift bioreactor were inoculated with a black smoker chimney sample collected on TAG site on the Mid Atlantic Ridge. To mimic as close as possible environmental conditions the cultures were performed in oligotrophic medium, with nitrogen hydrogen and carbon dioxide ($N_2 / H_2 / CO_2$) gas sweeping. Also the temperature was first settled at a temperature of 85°C and colloidal sulphur was added. Then the temperature was lowered to 60°C and sulphur was omitted. Archaeal and bacterial diversity was studied in both culture and natural samples. Through 16SrRNA gene sequences analysis of the enrichment cultures micro-organisms affiliated to Archeoglobales, Thermococcales were detected in both conditions while, Deferribacterales and Thermales were detected only at 65°C in the absence of sulphur. SSCP and Q-PCR permit to study the microbial community dynamic during the two enrichment cultures. The effect of environmental changes (modification of culture conditions) i.e. temperature, medium composition, electron donors and acceptors availability were shown to affect the microbial community in culture, as this would happen in their environment.

Introduction

Hydrothermal chimneys are porous mineral structures that precipitate as a result of mixing of the high temperature anoxic fluids with the cold oxygenated sea water. In hydrothermal chimneys, environmental chemical and physical conditions can change quickly on both time and spatial scale. They so represent diverse habitats for a wide range of physiologically and phylogenetically diverse microbial communities. Numerous cultural approaches led to the isolation and description of a great diversity of novel species belonging to the domains Archaea and Bacteria, the metabolic properties of which are likely to cover all biogeochemical cycles (Miroshnichenko and Bonch-Osmolovskaya, 2006; Takai et al., 2008). Otherwise, molecular diversity studies provided an overview of hydrothermal chimneys microbial communities. They revealed the presence of a large and in many cases unexpected microbial diversity (Takai and Horikoshi, 1999b; Nercessian et al., 2005a). Cultural approaches represent a promising way to address the questions of the ecosystem functioning and to link a metabolism to a phylogenetic group. Besides, they remain necessary to describe new microbial representatives thriving in hydrothermal deep-sea vents. They allow the study of *in situ* living prokaryotes that express their physiological

properties as members of the natural microflora. Among the diverse cultural techniques developed during the past decade, continuous cultures in bioreactors have proven their efficiency in the cultivation and physiological study of hyperthermophilic prokaryotes from deep-sea vent (Raven et al., 1992; Godfroy et al., 2000; Postec et al., 2005b). The use of bioreactors that might allow to better simulate environmental conditions appears to have a great potential to assess how modification of these conditions may affect the structure of microbial communities in hydrothermal chimneys. As a kind of example, Houghton and col (Houghton et al., 2007) used a special device to enrich nitrate-reducing or sulphate-reducing thermophiles under high pressure and at high temperature. They used their equipment with success to study the effect of fluid chemistry on microbial communities.

In our laboratory, a gas-lift bioreactor allowing the long term cultivation of prokaryotes by enabling a continuous substrate supply and an elimination of volatile metabolic end products (by gas sparging), was used to perform enrichment cultures with deep sea vent chimney samples. Previous continuous cultures performed with this equipment in parallel to batch cultures demonstrated the efficiency of this system over classical batch cultures by enabling the cultivation of a larger fraction of the natural community (Postec et al., 2005b).

In previous experiments with this bioreactor, enrichment cultures from hydrothermal chimney samples were performed under anaerobic conditions, at 90°C and 60°C, pH 6.5 and using a complex and rich medium containing carbohydrates, peptides, sulphate and sulphur. Archaeal and bacterial diversity was studied using molecular tools (i.e. DGGE and cloning/sequencing of 16S rRNA genes). Not only these studies showed the efficiency of such system to obtain greater diversity in culture, but also led to the isolation of new species and enabled to hypothesize metabolic interactions between species (Postec et al., 2005b; Postec et al., 2007).

Today, one promising way to grow as-yet uncultivated microorganisms is to permit inter-species interactions and to examine microbial metabolisms inside communities rather than to extrapolate them from pure cultures (Tor et al., 2003). The bioreactor represents a powerful tool to investigate *in vitro* interactions between populations that may occur *in situ*. In addition, the gas-lift bioreactor permits the maintaining of community culture for a long period. It thus represents a suitable device to investigate *in vitro* the effect of physico-chemical perturbations on the microbial community structure from deep-sea hydrothermal vents. This system is particularly suitable for the study of the communities inhabiting such a disturbed system.

So far, chemoorganotrophic enrichment cultures with hydrothermal chimney samples were mainly performed with media containing high concentration of organic matter. Few data are available about the organic matter concentration retrieved in deep-sea vent chimneys, but it can be assumed that it might vary from high concentration to oligotrophic conditions.

In the present study, we used the gas-lift bioreactor to study the microbial diversity and dynamics of thermophilic communities from a deep-sea hydrothermal vent. A black smoker chimney sample was used to inoculate the gas-lift bioreactor using the medium described in Postec et al. (Postec et al., 2005b) with a 100- fold diluted organic matter concentration, the enrichment was performed (i) in the presence of hydrogen and carbon dioxide (nearer to the environmental conditions) at 85°C with colloidal sulphur, then (ii) after reinoculation, temperature was decreased to 60°C and the sulphur was removed from the medium in order to investigate the effect of a temperature shift and a change of the chemical environment on the microbial community structure. This change mimicked an environmental change such as those encountered commonly at deep-sea vents. The microbial community structure and composition within the enrichment culture was analysed using the molecular techniques based on 16S rRNA genes including cloning / sequencing, SSCP, and quantitative-PCR, in order to assess both diversity and dynamics.

Materials and methods

Samples

In 2005, an active chimney sample was recovered from the hydrothermal site “TAG” (26°08'N, 44°49'W) located on the Mid-Atlantic Ridge (MAR) during the EXOMAR cruise. This sample (EXO15E1) was collected with the Remotely Operated Vehicle (ROV) Victor 6000, and brought to the surface into an insulated box under aseptic conditions (Figure 1). On board, chimney fragments were crushed into an anaerobic chamber under N₂/H₂/CO₂, 90:5:5 gas atmosphere (La Calhene, France) and was immediately transferred into a flask, filled with sterile seawater and preserved under anaerobic conditions (N₂/H₂/CO₂, 90:5:5 gas phase) at 4°C. This suspension was used to inoculate the enrichment cultures. An aliquot was preserved at –80°C for DNA extraction.

DNA extraction and ribosomal 16S rRNA gene amplification:

DNA extractions from both culture samples and chimneys were performed using the FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MPBiomedical) (Webster et al., 2003). For the chimney sample, four parallel extractions were performed and the DNA was then pooled and concentrated. The 16S rRNA genes from the extracted DNA were then amplified using specific primers corresponding to both archaeal and bacterial domains; Archaeal 16S rRNA genes were amplified using 344F and 915R or 4F and 1492R. Bacterial 16S rRNA genes were amplified using 8F and 1492R. PCR products were subsequently cloned with the pGEM[®]-T Vector cloning kit (Promega) according to the manual of the manufacturer.

Continuous enrichment culture in a gas-lift bioreactor:

Medium

The growth medium was the modified SME medium (Sharp and Raven, 1997) modified by Postec et al/ (Postec et al., 2005a; Postec et al., 2007) in which organic matter concentrations were as follows :0,01 g.L⁻¹ yeast extract (Difco), 0.005 g.L⁻¹ casaminoacids (Difco), 0.004 g.L⁻¹ glucose, 0.004 g.L⁻¹ dextrin (from corn), 0.002 g.L⁻¹ galactose, 0.002 g.L⁻¹ dextran, 0.001 g.L⁻¹ glycogen, 0.002 g.L⁻¹ pyruvate and 0.001 g.L⁻¹ acetate (all purchased from Sigma) corresponding to a total organic substrates concentration of 0.031 g.L⁻¹. The medium was supplemented with 2 g.L⁻¹ of colloidal sulphur during the first part of the enrichment culture (F1) while no sulphur was added for the second part (F2).

The medium was sterilized by filtration (Sartroban, 0.22 µm) into a sterile 20 L Nalgene bottle. When sulphur was added to the medium, the colloidal sulphur solution was sterilized directly in the Nalgene bottle by heating twice at 100°C for 30 min on two successive days.

Culture conditions

The culture was performed in a 2 L glass gas-lift bioreactor (Raven et al., 1992; Godfroy et al., 2006), at 85°C and 60°C (respectively for F1 and F2) and the pH was regulated at 6.5. Temperature and pH were controlled by a 4-20 mA Controller and AFS Bio Command system from New Brunswick (Nijmegen, the Netherlands) connected to a pH transmitter (Broadley James) associated to a gel pH electrode (Mettler Toledo) and a PTFE-covered PT100 temperature probe associated to a temperature controlled heated circulated bath (Huber) filled with water. Acid (1 N HCl) and base (1 N NaOH) were added using peristaltic pumps (Masterflex). The bioreactor was inoculated with 40ml of the chimney sample (EXO15E1) suspension (2%). Fresh medium feeding and product draw-off were performed using peristaltic pumps (Masterflex). The culture was continuously flushed with N₂/H₂/CO₂ (75/20/5) (0.2 v.v.min⁻¹) to maintain anaerobic conditions. The bioreactor was maintained as a batch culture for the first 24h to prevent wash-out of the cells before they growth. After 24 h, fresh medium was provided by applying a dilution rate of 0.04 h⁻¹. The first part of the enrichment culture (F1) was performed in presence of elemental sulphur at 85°C. After 26 days (624 h), the sample was reinoculated, the sulphur containing medium was replaced by a medium without sulphur and the temperature was lowered to 60°C. After a batch period of 30 h a dilution rate of 0.04 h⁻¹ was applied an this second culture (F2) was maintained for 22 days (528 h).

Culture monitoring and sample preservation

Cell concentration was determined every day by direct cell counting, using a Thoma chamber (0.02 mm depth) viewed with an Olympus BX60 phase contrast microscope (X400 magnification). Culture samples from the bioreactor were collected every 48h, from T4 (day 4) to T20 (day 20) for F1 and from T5 (day 5) to T14 (day 14) for F2. For each sampling, two 15 ml aliquot of culture were preserved anaerobically (under N₂/H₂/CO₂ (75/20/5)) at 4°C in serum vial. For DNA extraction, cells were recovered from 15 ml of culture by centrifugation (20 min at 8,000·g). Cell pellets were then resuspended in 5 ml of lysis buffer TE-Na 1·(Tris–HCl pH 8, 100 mM ; NaCl 100 mM, EDTA pH 8, 50 mM), and stored at –80°C until DNA extraction.

Amplification of the 16S rRNA gene and SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) analysis

Amplification of the V3 region of SSU rDNA genes from culture DNA samples was performed with primers W49F (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3') for bacterial domain, W116F (5'-TET-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') for archaeal domain, and W104R (5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') as the universal reverse primers. An initial denaturation step at 94°C for 2 min, was followed by 25 cycles of a three-stage program with 30' at 94°C, 30' at 51°C for Archaea and 61°C for Bacteria, and 30' at 72°C, and a final elongation for 10 min at 72°C. DNA polymerase was *pfu* Turbo (Stratagene) that generated blunt-ended PCR fragments. For electrophoresis, PCR SSCP products were diluted 10 times in water before mixing with 18.8µl formamide Hi-Di (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 0.2µl internal standard internal DNA molecular weight marker Genescan-400 HD ROX (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) (Delbes et al., 2000). 1 µl of template was added to the mix. The sample mixture was denatured at 95°C for 5 min and immediately cooled on ice before loading on the instrument. SSCP analyses were performed on an automatic sequencer abi310 (Applied Biosystem). The non-denaturing polymer consisted of 5% CAP polymer, 10% glycerol and 3100 buffer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The migration time was set at 30 min at 32 °C and 12 kV . The results obtained were analysed by SAFUM 2.0 Statistical Analysis of Fingerprints Using Matlab (Loisel et al., 2006; Zemb et al., 2007). To identify SSCP peaks of interest, 16S rRNA gene clone from the clone library were amplified by SSCP-PCR and analysed by SSCP under the same conditions and the resulting peaks were compared to those of the communities' pattern.

16SrDNA sequencing and phylogenetic analysis:

DNA fragments obtained were sequenced at OUEST-Genopole (Roscoff, France). Sequences were compared to those available in databases using the BLAST network service to determine phylogenetic affiliations. Sequences were aligned using the ClustalW program with the BioEdit software version 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). 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 inferred topologies was tested by the bootstrap resampling of trees calculated on the basis of the evolutionary distance, neighbor-joining algorithm with Jukes–Cantor correction.

Quantification of Archaeal and Bacterial community by Quantitative PCR (Q-PCR)

All Q-PCR experiments were run using an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR thermocycler equipped with 7300 Real-Time PCR Software. Q-PCR conditions were as follow: 12,5µl Absolute blue q-PCR Rox mix (AbGene), 400 nM final concentration of each primers, 200nM final concentration for bacterial and archaeal TaqMan probes, 1 µl template and water added to a final volume of 25 µl. All reactions were done in 96 well q-PCR plates.

Archaeal 16SrDNA genes were detected using the primer set Arch349F (5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3') and Arch806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'). The TaqMan probe was Arch516F (5'-TGYCAGCCGCCGCGGTAHACCVGC-3') (Takai and Horikoshi, 2000b). *Thermococcus litoralis* DNA was used as the quantification standard in 10-fold dilutions ranging from 10⁰ to 10⁻⁷. Thermocycling was performed as follows: 50°C for 2 min, initial denaturation 95°C for 15 min; amplification 40 cycles, denaturation 95°C for 25s, primer annealing 60°C for 6 min.

Bacterial 16SrDNA genes were detected using the primer set 331F (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT -3') and 797R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'). The TaqMan probe was 6-FAM-5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC -3'-TAMRA (Nadkarni et al., 2002).

Plasmid harbouring *Deferribacter. sp* plasmid DNA was used as the quantification standard in 10-fold dilutions ranging from 10⁰ to 10⁻⁷. Thermocycling was performed as follows: 50°C for 2 min, initial denaturation 95°C for 15 min; amplification 40 cycles, denature 95°C for 15s, primer annealing 60°C for 1 min.

The TaqMan probes had a fluorescent reporter dye (6-carboxyfluorescein) covalently attached to the 5'-end and a fluorescent quencher dye (6-carboxytetramethylrhodamine) attached six or more bases downstream from the reporter dye.

Nucleotide sequence accession numbers

The EMBL accession numbers of the sequences used in this study are FM242714 to FM242737

Virus detection

Three samples from the enrichment culture F1 (F1T14, F1T18 and F1T20) were used for virus-like particles observation. All solutions (i.e., sodium pyrophosphate, ultrapure water...) were filter-sterilized on 25 mm anodisc syringe-filter membranes with pore sizes of 0.02 μm . An aliquot (0.5ml) of culture or MilliQ water (negative control) was taken and added to 4 ml of MilliQ water and 1 ml of sodium pyrophosphate (10 mM final concentration) and incubated for 15°C at room temperature. After incubation, samples were centrifuged at 10000g for 20 min. The supernatant was then filtered through a 0.8 / 0.2 μm filter (acrodisc 25 mm PF syringe-filter 0.8/0.2 μm support membrane). In order to eliminate uncertainties in virus counting due to extra cellular interference, 2 μl of DNase (Turbo DNase Ambion 2U/ μl) was added to each sample and incubated for 10 min at 37°C. The supernatant was finally filtered through a 25 mm anodisc membrane with pore sizes of 0.02 μm and stained with 100 μl of SYBR Green I or SYBR Gold (10 X) for 15 min in the dark, 100 μl of an anti-fading solution were also added on the filter.

Samples (F1T14, F1T18 and negative control) were observed immediately after preparation. The observation of virus-like particles in each sample was made from duplicate filters and from at least 10 randomly selected fields per filter, using a LEICA QWin Pro Version 2.3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) microscope.

RESULTS

1. Archaeal and bacterial diversity in the chimney sample

Archaeal diversity in the chimney sample was low since only sequences related to the genus *Thermococcus* were retrieved (Figure 2). Within this genus, 2 sequences were detected: the first one referenced as AEXO15.8 (71 clones) was affiliated to *Thermococcus gammatolerans* (isolated from the Guaymas Basin) and the second one referenced as AEXO15.4n (24 clones) was closely related to *Thermococcus hydrothermalis* (isolated from the East Pacific Rise).

Concerning 16S rRNA bacterial diversity, the majority of the sequences were affiliated to the *Alpha*, *Delta* and *Epsilonproteobacteria* (Figure 3). Within the *Epsilonproteobacteria*, numerous sequences were related to environmental sequences. Clones BEXO15.90 and

BEXO15.58 (respectively 22 and 2 clones) were affiliated to *Sulfurimonas autotrophica*, a strain which was isolated from deep-sea sediments at the Hatoma Knoll in the Mid-Okinawa Trough hydrothermal field. BEXO15.43 (5 clones) (Lopez-Garcia et al., 2002) was affiliated to an uncultured bacterium clone within the group of *Sulfurovum* species. Other sequences BEXO15.37 (38 clones) within the *Epsilonproteobacteria* were close to Clone 2 detected in a microbial diversity study of an *in situ* growth chamber at deep sea hydrothermal vents. In the *Alphaproteobacteria* group, sequence BEXO15.13 (1 clone) affiliated to *Sulfitobacter* and *Thalassobius* species. Finally, in the *Deltaproteobacteria* group, one sequence BEXO1580.56 was related to a Mud Volcano clone (AM404330) from the Haakon Mosby Mud Volcano, (Barents Sea) within the group of *Desulfobacteriales*.

2. Culture enrichment at 85°C with colloidal sulphur

A continuous enrichment culture was performed in a gas-lift bioreactor to study the culturable fraction of the microbial diversity of a chimney from the TAG Mid-Atlantic Ridge (MAR) hydrothermal site using oligotrophic conditions and high temperature. Analyses of the compositional changes in the bacterial and archaeal communities in response to a shift in two environmental factors were also performed.

The first part of the enrichment culture in the bioreactor (F1) was performed at 85°C in the presence of colloidal sulphur. Starting from 3.1×10^6 cell ml⁻¹ at T4, cell density reached 1.8×10^7 cell ml⁻¹ at T18 and decrease at T20. Coccoid cells single or in pairs were dominant (Figure 4).

2.1. Quantitative PCR and 16S rRNA gene diversity results:

According to Q-PCR results, Archaea were dominant and this was confirmed by the absence of amplification using bacterial primers. 16S rRNA gene diversity analysis of enrichment culture samples showed the presence of numerous archaeal sequences related to the genus *Geoglobus* and *Thermococcus* (Table 1). *Thermococcus* retrieved sequences were affiliated to *Thermococcus coalescens* and *Thermococcus siculi* at the beginning of the culture (T6), while all retrieved sequences at T14 and T20 were affiliated to *Thermococcus hydrothermalis* and *Thermococcus siculi* respectively. At the beginning of the enrichment, one sequence related to the genus *Aeropyrum* was present. Sequences related to *Geoglobus* were detected all along the culture.

2.2. CE-SSCP:

In order to study the archaeal community structure dynamic by CE-SSCP, control, i.e, clones sequenced previously and affiliated to *Thermococcales* sp. and *Geoglobus* sp. with

respectively 98 and 97 % of similarity were used. CE-SSCP is a semi-quantitative method, and according to the results obtained, an increase in the *Thermococcales* population could be witnessed starting from T8 until T18. This can be correlated as well with the increase noted in cell number. At T20, the “*Thermococcales* peak” was smaller, this was in compliance with the diminution of the total cell density. *Geoglobus* *sp* remained present during throughout the culture even when the global cell number decreased in the culture.

2.3. Virus like particle:

The recent evidence of astonishing virus populations associated with hydrothermal species of *Thermococcales* (Geslin et al., 2003) led us to search for the presence of viruses in the culture to try to understand the decrease in cell number at T20. Using epifluorescence microscopy, virus-like particles were detected in two culture samples (T14 and T18). The presence of numerous virus-like particles as found (Figure 5) at T14 might explain the decrease in the cell density observed at T20.

3. Enrichment culture at 60°C without colloidal sulphur

Because of the decrease in cell numbers, the bioreactor was inoculated again using 40 ml of the chimney sample EXO15E1.

The temperature was settled at 60°C and sulphur was omitted in the culture medium, such conditions were chosen as being less favourable for the growth of *Thermococcus* species. In this second culture (F2) both rods and coccoid cells were observed. Starting from 6.25×10^6 cell.ml⁻¹ at T0 cell density reached its maximum value at T14 with 3.13×10^7 cells.ml⁻¹ (Figure 6).

3.1. Quantitative PCR and phylogenetic results:

Both Archaea and Bacteria were present in the culture. Archaea were dominant at the beginning of the culture (ratio varying from 70 to 80%). Archaeal and Bacterial proportions were roughly the same at the end of the culture (Figure 6).

The 16S rRNA gene diversity analysis of this second enrichment culture showed again the presence, within the archaeal community, of species belonging to the genera *Geoglobus* and *Thermococcus* (Table 1 and Figure 2). Within the genus *Thermococcus* only sequences related to *Thermococcus hydrothermalis* were detected. Analysis of the bacterial community showed the presence of species related to the genus *Deferribacter* and *Vulcanithermus*; sequences were respectively affiliated to *Deferribacter abyssi* (99% 16S rRNA gene sequence similarity and *Vulcanithermus mediatlanticus* (96 % similarity) (Figure 3).

3.2. CE-SSCP:

In culture F2 only the bacterial community dynamic was studied. As described above for culture F1 previously sequenced clones affiliated to *Deferribacter. sp* and *Vulcanithermus. sp* were used to identify peaks in the profiles. A small increase of the “*Deferribacter*” peak can be observed but no strong variations were noted all along this enrichment culture.

Discussion

A low diversity in the chimney sample used as an inoculum

This low archaeal diversity is quite surprising compared to previous studies but can be explained by (i) the age of the chimney and/or (ii) methodological biases.

The hydrothermal chimney sampled at the TAG site had a mineral matrix dominated by anhydrite (80-90%), chalcopyrite (5-7%) and pyrite (2-3%), as determined by X-ray diffraction analysis (Yves Fouquet, personal communication), forming a complex mineral assemblage. This type of mineralogical composition is assumed to correspond to young active hydrothermal chimneys. As a rule, hydrothermal chimney formation begins with the precipitation of anhydrite due to the interaction between reduced hydrothermal fluid and sea water. The sea water that can then circulate by advection current through the porous anhydrite chimney matrix leads to continuous input of sea water components including organic matter. In the present case, the chimney was surrounded by a large community of shrimps *Rimicaris exoculata* (Figure 1). Consequently, the organic matter due to the shrimp swarm was obviously present in suspension in the sea water around the chimney and could explain the dominance of chemoorganotrophic species such as *Thermococcales*.

Several studies reported that there is a relationship between the chimney mineral composition and the microbial community composition (Page et al., 2008; Takai et al., 2008). Depending on the geographical location of black smokers, distinct archaeal and bacterial communities were retrieved (Schrenk et al., 2003; McCliment et al., 2006; Page et al., 2008). These compositional differences were associated with the mineralogical and geochemical settings of the chimneys.

Bacterial diversity in this study showed the presence of sequences affiliated to *Proteobacteria* (*Epsilon*-, *Alpha*- and *Delta*-); Some sequences were related to environmental clones and other were affiliated to species involved in the sulphur metabolism including sulfate-reducers (*Desulfobulbus*-related clones) and chemolithoautotrophic or chemoorganoheterotrophic sulphur compound-oxidizers (*Sulfurimonas*, and *Sulfuribacter* related clones).

The low diversity obtained might also be explained by the method used for the 16S rRNA gene amplification. Teske and Sorensen have recently shown that the archaeal detection depends on the specificity of the archaeal PCR 16S rRNA primers; only one pair of primers was used in this study. PCR surveys with a multiple primers combination would contribute to a better view of the archaeal community within the chimney sample (Teske and Sorensen, 2007).

Diversity of the cultured microbial community: Dynamics and effect of environmental conditions.

At 85°C, in the presence of sulphur (Culture F1) the cultivated microbial community in the bioreactor was mainly composed of hyperthermophilic archaeal species belonging to the genera *Thermococcus* and *Geoglobus*.

Thermococcus species are widespread within hydrothermal ecosystems. Numerous species were isolated from these environments; described species are chemoorganotrophic organisms that can use both proteinaceous and carbohydrates substrates. Some species were described as being able to use amino acids or organic acids as pyruvate, acetate as carbon sources. Most species of this genus were shown to grow better in the presence of elemental sulphur. They were also shown to be inhibited by hydrogen when grown in batch closed culture vessels, this inhibition being alleviated by the addition of sulphur. The growth of *Thermococcus* species in our experiment was made possible by the presence of complex organic carbon substrates, carbohydrates and organic acids. Despite the presence of hydrogen in the gas phase (Godfroy et al., 1996; Godfroy et al., 1997; Marteinson, 1999; Atomi et al., 2004), the addition of elemental sulphur had allowed their growth.

Interestingly, the presence of prokaryotes related to *Geoglobus ahangari* (Kashefi et al., 2002) was shown all along the culture F1 and F2. *Geoglobus ahangari* is an hyperthermophilic anaerobic euryarchaeon able to grow chemoorganotrophically on organic acids, amino acids and short-chain fatty acids and autotrophically on hydrogen with Fe(III) (poorly crystalline Fe(III) oxide) serving as favourite electron acceptor. Active chimneys of the hydrothermal site TAG are mainly composed of iron-containing minerals, including pyrite (FeS₂) and chalcopyrite (CuFeS₂) (Campbell et al., 1988; Charlou et al., 2002). Up to 1640µM of Fe was measured in the hydrothermal fluid. Like shown in Figure 1, the black smoker is surrounded by a community of shrimps. Recent studies have revealed an important iron oxide deposits in the gill chambers of shrimps (Corbari et al., 2008; Schmidt et al., 2008). The presence of iron oxides in the immediate proximity of the TAG vent may have a substantial impact on microbial community inhabiting the chimney and may be a source of iron oxide by providing Fe (III) oxides. If the strain present in the bioreactor has the same

requirements than *Geoglobus ahangari*, the presence of ferric iron (Fe (III)) available for its growth may have been supplied by the chimney sample, as no Fe (III) was added to the medium. The presence of both acetate and pyruvate in the culture medium, the production of short-chain fatty acids as known metabolic products of the metabolism of proteinaceous substrates by *Thermococcus* species (Godfroy et al., 1996; Godfroy et al., 1997), and the presence of hydrogen in the gas phase may have allowed the build up of suitable conditions for the growth of this organism. *Geoglobus* species were detected in the culture from T6 to T20 and, based on SSCP results; they even dominated the beginning of the culture. Microorganisms able to perform dissimilatory Fe (III) reduction were already detected in deep sea hydrothermal chimneys from the East Pacific Rise; these species belonged to various genera such as *Archaeoglobales*, *Deferribacterales* or *Thermotogales* (Slobodkin et al., 2001; Kashefi et al., 2002). Their presence on the Mid Atlantic Ridge chimneys on TAG site (this study) but also in other MAR samples was demonstrated by obtaining positive enrichments on specific iron reducer medium (Kashefi et al., 2002) (Holden pers. com). All these results together suggest that within hydrothermal habitat, Fe (III) reduction could be an important metabolism being realised by *Geoglobus* related species at temperatures above 90°C and other species as *Deferribacter* at lower temperatures. At the beginning of the enrichment culture F1, a sequence affiliated to the genus *Aeropyrum* was detected. The two species of this genus *Aeropyrum camini* and *Aeropyrum pernix* are strictly thermophilic aerobic species (Sako et al., 1996; Nakagawa et al., 2004a). Their presence can be explained by possible not strictly anaerobic conditions at the beginning of the culture as this could happen by oxygenated sea water intrusion by advection into hydrothermal chimneys.

After 20 days of culture, an important decrease in the cell density was noted in order to explain this decrease, the culture was checked for the presence of viruses. The results obtained allow us to detect the presence of virus-like particle in the culture and also to deduce their role on the microbial community. Up to date, the only hyperthermophilic marine virus described, PAV1, was shown to persist in its host strain, *Pyrococcus abyssi*, in a stable carrier state without spontaneous lysis (Geslin et al., 2003). Indeed, only one archaeal virus, isolated from a hot and acidic habitat, is known to cause lysis of its host cells (Haring et al., 2005). According to SSCP data, *Geoglobus* peak surface did not seem to change while the total cell concentration decreased in the culture suggesting that only Thermococcales were affected by virus like-particles.

Moreover, *Thermococcus*-related phylotypes retrieved from the enrichment culture in bioreactor were affiliated to *T. coalescens* and *T. siculi* at the beginning of the culture at 85°C (F1), whereas at the end and during the culture at 60°C (F2) *Thermococcus*-related phylotype were affiliated to the group of *T. hydrothermalis* indicating a decrease of the

diversity of “Thermococcales”. The second enrichment culture was performed at 60°C in the absence of elemental sulphur. When grown in the absence of sulphur, *Thermococcus* species are known to produce hydrogen as an end metabolic product. In addition, hydrogen was present in the gas phase (20% hydrogen). Despite those *a priori* unfavourable conditions, *Thermococcus* species grew. We can hypothesise that not only the cultivation of *Geoglobus* species but also *Deferribacter* species that use hydrogen as electron donor to grow autotrophically, allowed the growth of *Thermococcus* species by lowering the hydrogen concentration in the medium.

Decreasing the temperature to 60°C in the second enrichment culture (F2) allowed the growth of thermophilic Bacteria. One species closely related to *Deferribacter abyssi* was detected, this species is a chemolithoautotrophic thermophilic bacteria and can grow using hydrogen, formate, propionate as electron donors and elemental sulphur, nitrate or Fe(III) as electron acceptors (Miroshnichenko et al., 2003b). Also species closely related to the hydrothermal species *Vulcanithermus mediatlanticus* was detected; this species is a thermophilic chemoorganotrophic bacteria that use oxygen or nitrate (in anaerobic conditions) as electron acceptor (Miroshnichenko et al., 2003d). Again the growth of both chemolithotrophic or mixotrophic and chemoorganotrophic species was made possible by the way of metabolic interactions.

With the exception of *Thermococcus* species, all the species detected in the enrichment culture were absent in the molecular inventory of the diversity performed with the chimney sample. This demonstrates that both cultural and molecular approaches are complementary to assess the microbial diversity in hydrothermal chimneys. The use of low organic matter concentrations allowed the growth of the same chemoorganotrophic species as those obtained in high organic substrates conditions but also allowed the enrichment of a greater metabolic diversity of organisms (Postec et al., 2005b; Postec et al., 2007).

Metabolic (or phenotypic) diversity within already known species and cultivable species but not isolable species.

Based on the molecular data that identified sequences related to cultured microorganisms formerly described, several medium were designed for the sub-cultivation in vials and the isolation of the detected strains. As previously described (Postec et al., 2007), media referenced as DS and DN were tested and allowed the cultivation and isolation of the *Deferribacter* strain. This species is closely related to *D. abyssi* and able to grow on acetate as carbon source and nitrate as electron acceptor. Several attempts to cultivate the strain of *Vulcanithermus* sp., including the use of the enrichment medium in aerobic conditions or

anaerobic conditions in presence of nitrate and the use of *V. mediatlanticus* type strain isolation medium (Miroshnichenko et al., 2003d) remained unsuccessful.

Also attempts to obtain *Geoglobus* species using *G. ahangari* medium (Kashefi et al., 2002) remained unsuccessful when enrichment culture samples were used as inoculum. Nevertheless positive culture were obtained on *G. ahangari* medium (Kashefi et al., 2002) using pyruvate as electron donor and poorly crystalline Fe(III) oxide as electron acceptor with the chimney sample as inoculum. Sequencing of the 16S rRNA genes retrieved from the isolated species assigned it as a *Thermococcus* sp. The difficulty in obtaining detected species in pure culture could be explained by the existence of metabolic diversity within known groups.

For example, while most *Thermococcus* species are known to be sulphur-dependant, hydrogen sensitive and chemoorganotrophs, Sokolova and coll described one species of *Thermococcus* able to grow lithotrophically by oxidizing carbon monoxide (Sokolova et al., 2004). In our study we have shown the growth of *Thermococcus* species in the absence of sulphur and the presence of hydrogen, and also the growth of *Thermococcus* species using pyruvate as carbon source, and iron oxide as electron acceptor. These observations suggest the presence of a greater metabolic diversity than commonly admitted within the *Thermococcus* genus, with species using a wide range of electron donors and acceptors. These species may have adapted their metabolism to the chemical variations of their environment. This might explain why *Thermococcus* species are present in all hydrothermal vents samples (according to both cultivation approaches and molecular survey). Their ability to grow quickly (Postec et al., 2005a), to thrive with instable conditions such as temperature changes (Postec et al., 2005b; Postec et al., 2007), availability of organic matter and in addition their persistence in cold oxygenated water (Huber et al., 1990a)) make them good candidates for early colonization of hot areas of new vent sites. Difficulties in isolating detected microorganisms might be due to their inability in growing as a pure culture.

Conclusion:

This enrichment culture in the bioreactor (*in vitro*) represents an fraction of the diversity of the hyperthermophilic and thermophilic microorganisms inhabiting the TAG chimney. The effect of environmental changes i.e. temperature and medium composition was shown to affect the microbial community in culture, as this could happen in their environment.

The availability of such a cultivation system to point out the co-existence of species using various electron donor and acceptor, carbon sources is a promising path to study the diversity of microorganisms. It offers the possibility to copy the variations of their environment and show how in hydrothermal chimneys microbial population follows one another. This was hypothesized by our precedent work (Postec et al., 2007) and confirmed in this study. The

modification of culture conditions, such as temperature, organic matter concentration, electron donors and acceptors availability allowed to enrich different population of prokaryotes inhabiting hydrothermal chimneys.

Again the cultivation of microbial community instead of pure culture appears to be the unique manner to get into the structure of active microbial communities, to study how micro-organisms interact in their environment and to discover the physiology and metabolic properties of micro-organisms.

Acknowledgements:

The authors want to thank the captain and crew of the research vessels Atalante and the Victor team for their work during the EXOMAR cruise (chief scientist Anne Godfroy). Frédérique Duthoit (LMEE, UMR 6197) is thanked for his help on the Q-PCR technique. All people working in the department of Microbiology LMEE laboratory in Brest are thanked for the hospitality and help during various part of the work. We also thank Jim Holden, Mathilde Le Roy and Helene Ver Eecke for their contribution on the isolation of ironreducing microorganisms. We thank Yves Fouquet for the mineralogical analysis of the chimney sample. This work was supported by ANR DEEP OASES and Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (grant for NB).



Figure 1: The black smoker EXO15E1 recovered by the arm “Maestro” of the Remotely Operated Vehicle (ROV) Victor 6000. Presence of shrimps swarm around the chimney.

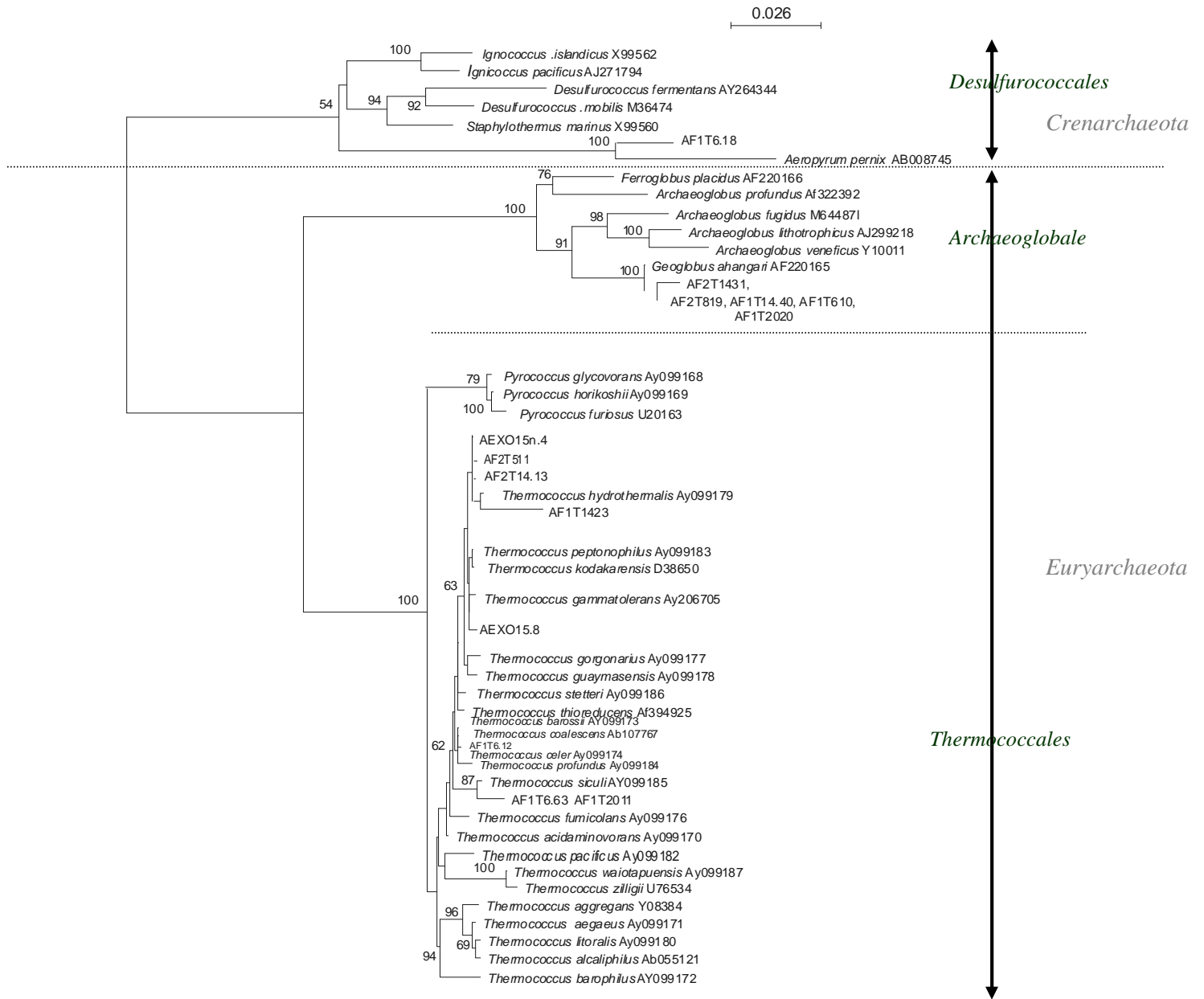


Figure 2: Phylogenetic analysis of archaeal 16S rDNA sequences obtained in the diverse study AEXO15 (chimney sample), F1 and F2 (enrichment sample) and determined by neighbor-joining analysis. The numbers at the nodes are the bootstrap values (as percentage). Bootstraps above 50% are displayed. For the analysis 824 sites were used with 500 bootstrap replicates. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position.

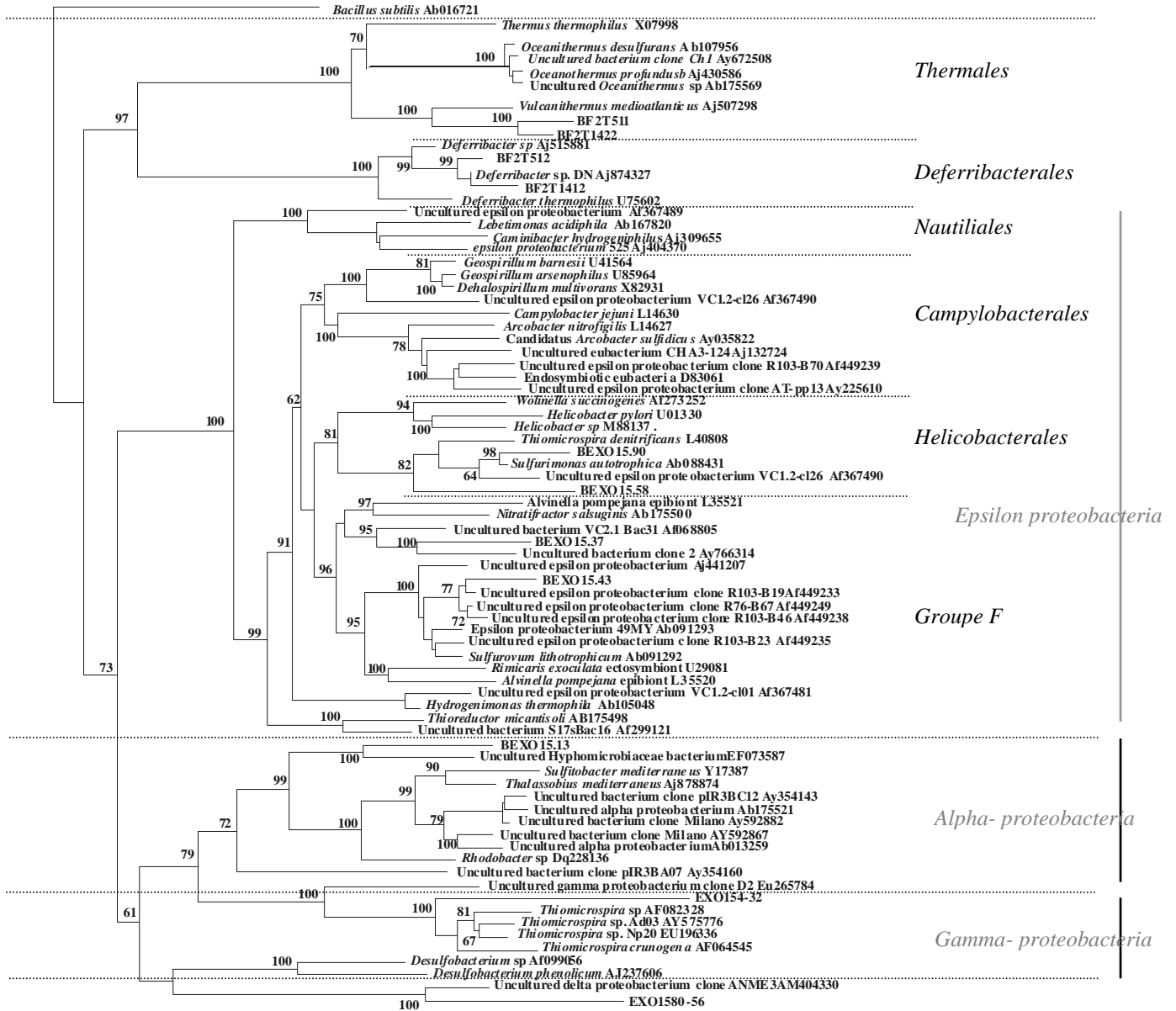


Figure 3: Phylogenetic analysis of bacterial 16S rDNA sequences obtained in the diverse study: BEXO15 (chimney sample), F1 and F2 (enrichment sample) and determined by neighbor-joining analysis. The numbers at the nodes are the bootstrap values (as percentage). Bootstraps above 50% are displayed. For the analysis 991 sites were used with 500 bootstrap replicates. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position.

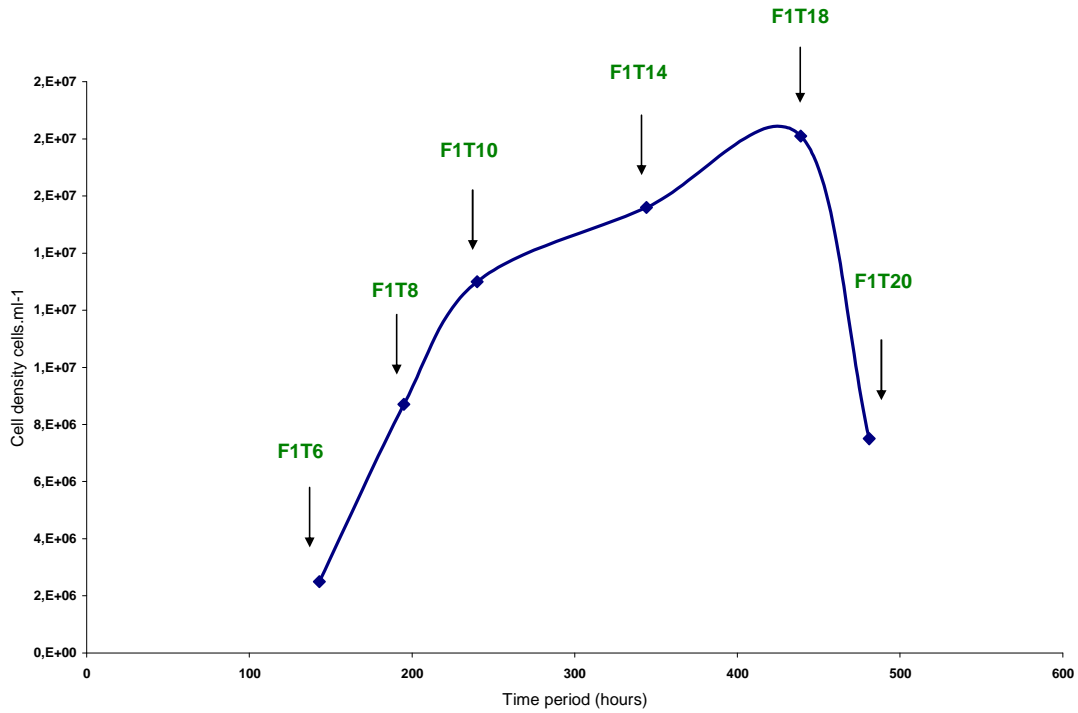


Figure 4: Cell densities of culture samples collected from T6 to T20 from the bioreactor. Cell densities are expressed in cell.ml⁻¹. The time period is expressed in hours, F1T6, F1T8, F1T10, F1T14, F1T18 and F1T20 correspond to the sampling date. F1 is for “first fermentation”, T6, T8, T10, T14, T18, T20 correspond to 6, 8, 10, 14, 18, and 20 days after the beginning of the culture.

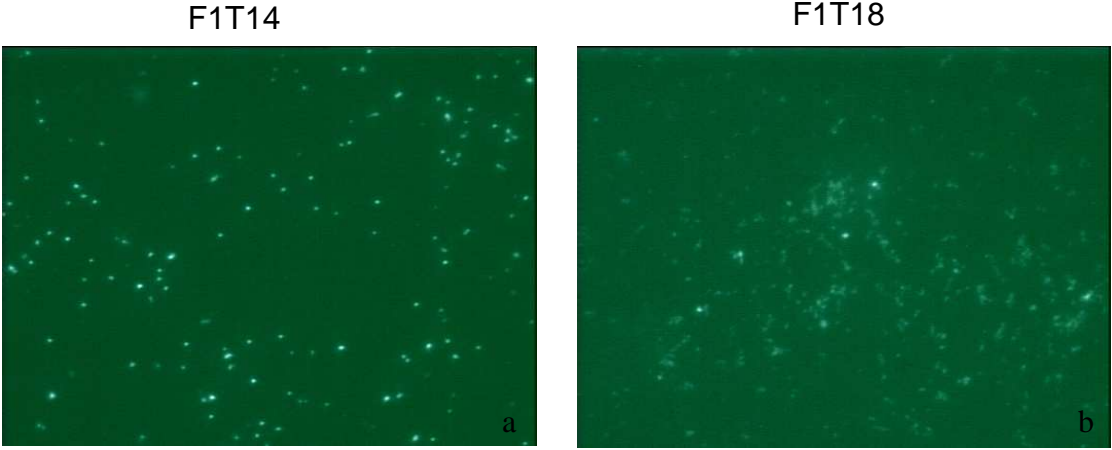


Figure 5: Epifluorescence pictures of two samples F1T14 (a) and F1T18 (b) prepared for virus detection.

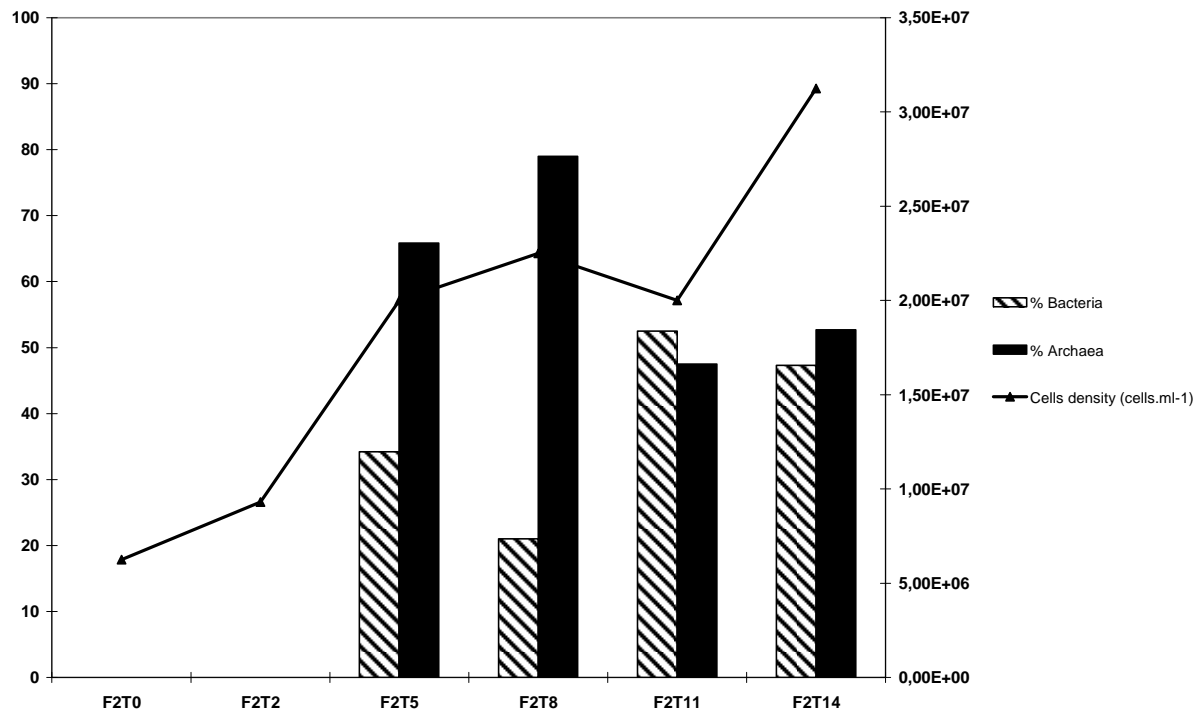


Figure 6: Total cell densities of the bioreactor culture F2 from T0 to T14 expressed in cells.ml^{-1} . Archaea and Bacteria ratio are expressed in percentages of total cells determined by q-PCR.

Table 1: Distribution and phylogenetic affiliations of archaeal and bacterial 16S rDNA sequences retrieved from the two enrichment culture (F1 and F2)

Culture sample	Phylogenetic affiliation	Number of clones	Closest match organism	Identity %
Enrichment culture F1				
T6	<i>Archeoglobales</i>	7	AF220165 <i>Geoglobus ahangari</i> strain 234	97
	<i>Thermococcales</i>	14	AB107767 <i>Thermococcus coalescens</i>	99
		2	AY099185 <i>Thermococcus siculi</i>	98
	<i>Desulfurococcales</i>	2	AB008745 <i>Aeropyrum pernix</i> K1	96
T14	<i>Archeoglobales</i>	6	AF220165 <i>Geoglobus ahangari</i> strain 234	97
	<i>Thermococcales</i>	13	AY099185 <i>Thermococcus hydrothermalis</i>	99
T20	<i>Archeoglobales</i>	2	AF220165 <i>Geoglobus ahangari</i> strain 234	97
	<i>Thermococcales</i>	11	AY099185 <i>Thermococcus siculi</i>	99
Enrichment culture F2				
T5	<i>Archeoglobales</i>	26	AF220165 <i>Geoglobus ahangari</i> strain 234	97
	<i>Thermococcales</i>	7	AY099163 <i>Thermococcus hydrothermalis</i>	99
	<i>Thermales</i>	43	AJ507298 <i>Vulcanithermus medioatlanticus</i>	96
	<i>Deferribacterales</i>	57	AJ515882 <i>Deferribacter abyssi</i>	99
T14	<i>Archeoglobales</i>	80	AF220165 <i>Geoglobus ahangari</i> strain 234	97
	<i>Thermococcales</i>	30	AY099163 <i>Thermococcus hydrothermalis</i>	99
	<i>Thermales</i>	88	AJ507298 <i>Vulcanithermus medioatlanticus</i>	96
	<i>Deferribacterales</i>	12	AJ515882 <i>Deferribacter</i> sp.	99

3. Résultats complémentaires : sous-cultures et isolements

L'étude moléculaire de la diversité des micro-organismes cultivés dans le bioréacteur a permis de mettre en évidence la présence d'espèces affiliées aux genres : *Deferribacter*, *Vulcanithermus*, *Aeropyrum*, *Geoglobus* et *Thermococcus*. Afin d'enrichir et d'isoler ces micro-organismes des sous cultures en flacons ont été réalisées.

Le choix des milieux utilisés pour ces enrichissements et isolements se base sur les caractéristiques du milieu utilisé lors des cultures en continu (F1 et F2), ainsi que les caractéristiques des milieux utilisés lors de la description de ces espèces dans la littérature.

3.1. Enrichissement de la souche affiliée aux *Thermococcus*.

Ces souches sont actuellement en cours d'enrichissement et d'isolement. Les premiers essais sont effectués en batch en utilisant les conditions de la culture F1.

3.2. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à *Deferribacter. Sp.*

Le tableau 9 ci-dessous résume les différents milieux et conditions testés ainsi que les résultats obtenus lors de l'enrichissement et l'isolement de *Deferribacter. sp.*

Dans un premier temps, les essais d'enrichissement ont été effectués à partir de l'échantillon F2T5 issu de la culture en bioréacteur (F2). La base minérale du milieu SME a été utilisée en y ajoutant de l'acétate, de l'ammonium, de la levure, des nitrates (milieu DN) ou du soufre (milieu DS) (Postec et al., 2007) sous H₂/CO₂ (80/20). La croissance des micro-organismes n'a pas été observée. Par la suite, les conditions de culture utilisées pour la caractérisation de la souche phylogénétiquement proche : *Deferribacter abyssi* (Miroshnichenko et al., 2003b) ont été utilisées avec de la même façon, un milieu avec nitrates et le second avec soufre. Plusieurs échantillons issus de la culture en bioréacteur ont servi d'inoculum ainsi que l'échantillon brut EXO15E1. Les différentes tentatives ont permis d'obtenir des cellules en cultures, des coques et des bâtonnets en mélange dans le milieu contenant du soufre et des bâtonnets uniquement dans le milieu contenant des nitrates. Après isolement par dilution en séries sur milieu nitrate à partir de l'échantillon F2T7, l'ADN a été extrait et le gène codant pour l'ARNr16S bactérien a été amplifié. L'analyse de la séquence obtenue a montré que la souche isolée appartenait à l'espèce *Deferribacter abyssi* (99% de similarité du 16S) qui est une bactérie thermophile, chimiolithoautotrophe, anaérobie isolée d'un site hydrothermal de la ride Médio-Atlantique (Miroshnichenko et al., 2003b). Comme la

souche décrite, la souche isolée est capable de pousser sur un milieu contenant de l'acétate comme donneur d'électrons, du soufre ou des nitrates comme accepteurs d'électrons. La souche isolée a été ajoutée dans la collection Ifremer sous le numéro EXO1326.

Tableau 9: Synthèse des essais d'isolement effectués pour la souche affiliée à *Deferribacter*, caractéristiques des milieux testés et résultats obtenus

Essai	Echantillon inoculé	Composition du milieu		Température	Phase gazeuse	Résultats obtenus	
1	F2T5 inoculé à 10%	Base minérale du SME + Acétate 0,16 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl 0,3 g.l ⁻¹ Levure 0,1 0,3 g.l ⁻¹ Pipes 6,05 g.l ⁻¹		60 °C	H ₂ /CO ₂ (80/20) à 2 bars	Quelques batonnets mais pas de croissance après plusieurs jours d'incubation dans les deux milieux testés.	
		<u>DS</u> : 5 g.l ⁻¹ de soufre colloïdal	<u>DN</u> : 2 g.l ⁻¹ de NaNO ₃				
2						+S ⁰	+NaNO ₃
	F2T5	Milieu utilisé pour la description de <i>Deferribacter abyssi</i> (Miroshnichenko et al., 2003b) avec 5 g.l ⁻¹ de soufre ou 2 g.l ⁻¹ de NaNO ₃		60°C sous agitation	H ₂ CO ₂ (80/20) à 2 bars	coques	-
	F2T7					Coques + bacilles	bacilles
	F2T10					-	-
	F2T14					-	-
	EXO15					-	Qq cellules

3.3. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à *Vulcanithermus sp*

Le tableau 10 ci-dessous résume les différents milieux et conditions testés ainsi que les résultats obtenus.

Les souches les plus proches phylogénétiquement *Vulcanithermus medioatlanticus* (Miroshnichenko et al., 2003d) et *Oceanothermus profundus* (Miroshnichenko et al., 2003c) sont microaérophiles, chimiolithoautotrophes et utilisent l'oxygène et les nitrates comme accepteurs d'électrons. Les premiers essais d'enrichissement ont été effectués en conservant comme base du milieu de culture, le base minérale SME en y ajoutant du saccharose, de la tryptone, de la levure et en tamponnant le milieu avec du Pipes (Tableau 10) et ce d'après données bibliographiques (Miroshnichenko et al., 2003d). Les cultures ont été effectuées (i) en anaérobiose (N_2/H_2 (90/10)) en présence de nitrates comme accepteur d'électrons et (ii) en aérobie (N_2/O_2 (75/25)). Des cellules en forme de bâtonnet ont été observées mais les cultures ne sont pas reparties après repiquage.

Par la suite, les milieux EM et GM utilisés respectivement pour l'enrichissement et la description physiologique de la souche *Vulcanithermus medioatlanticus* ont été testés (Miroshnichenko et al., 2003d). Dans les deux cas, plusieurs échantillons issus de la culture en bioréacteur ont servi d'inoculum et les incubations ont eu lieu avec et sans agitation. Des bâtonnets ont été observés mais les repiquages n'ont pas permis de croissance de la souche.

Tableau 10: Synthèse des essais d'isolement effectués pour la souche affiliée à *Vulcanithermus*, caractéristiques des milieux testés et résultats obtenus

Essai	Echantillon inoculé	Composition du milieu	Température	Phase gazeuse	Résultats obtenus
1	F2T5 F2T7 F2T10 F2T14 inoculé à 10%	Base minérale du SME ((Raven et al., 1992) Sucrose 2 g.l ⁻¹ Tryptone 1 g.l ⁻¹ Levure 0,5 g.l ⁻¹ Pipes 6,05 g.l ⁻¹ (+ NaNO ₃ 3 g.l ⁻¹ en condition anaérobie)	60 °C Sous agitation 100 rpm	N ₂ /H ₂ (90/10) anaérobie	Bacilles nombreux
				N ₂ /O ₂ (75/25)	Quelques bacilles
Pas de croissance suffisante des cellules pour effectuer un repiquage					
2	F2T5,F2T7,F2T10 F2T14	Milieu EM utilisé pour la description de de <i>Vulcanithermus medioatlanticus</i> (Miroshnichenko et al., 2003d)	60°C sous agitation	N ₂ /O ₂ (75/25)	Présence de bacilles jusqu'à 3 jours après l'ensemencement pour F2T10
	EXO15				
Pas de croissance après repiquage					
3	F2T5, F2T7, F2T10 F2T14	Milieu GM utilisé pour la description de de <i>Vulcanithermus medioatlanticus</i> (Miroshnichenko et al., 2003d)	65°C sans agitation	N ₂ /H ₂ (90/10) anaérobie	Présence de bacilles quelques jours après l'ensemencement de F2T10
Pas de croissance après repiquage					

3.4. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à *Aeropyrum. sp*

Une séquence affiliée au genre *Aeropyrum* a été mis en évidence dans un échantillon prélevé en tout début de la culture en bioréacteur F1T6. Les espèces du genre *Aeropyrum* sont des hyperthermophiles, aérobies strictes (Sako et al., 1996; Nakagawa et al., 2004a). Les essais d'enrichissement ont été effectués en utilisant la base minérale du milieu SME (Raven et al., 1992) additionné de 1 g/l de levure, 2 g/l de peptone et 6,05 g/l de PIPES. Les incubations ont été effectuées à 85 °C en présence d'oxygène et sous agitation. L'échantillon F1T6 a servi d'inoculum et a été utilisé à 1%. Après 24h d'incubation, quelques cellules ont été observées, un repiquage a été effectué mais aucune croissance de cellules n'a été observée. Un deuxième essai a été effectué en utilisant le milieu Marine Broth (Marine2216, BD Difco n°279110) supplémenté par 1 g.l⁻¹ de thiosulfate (Sako et al., 1996). Après 42h d'incubation à 85°C sous agitation quelques coques « déformées » ont été observées. Un repiquage a été effectué mais aucune croissance significative n'a été observée.

3.5. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à *Geoglobus ahangari*

Une *Archaea* hyperthermophile appartenant à l'ordre des *Archeoglobales* était présente dans les cultures d'enrichissement en bioréacteur. Phylogénétiquement, la souche détectée est proche de l'espèce *Geoglobus ahangari* décrite par Kashefi et al (Kashefi et al., 2002). Cette espèce oxyde l'hydrogène H₂ et réduit le Fer (III) et seulement sous forme de « Poorly cristalline iron oxide », elle n'utilise pas ou très peu le citrate de fer par exemple ; en condition anaérobie. Elle est capable de se développer avec du CO₂/H₂ et du Fer (III) mais est aussi capable d'oxyder de nombreux composés organiques tels que la peptone, les acides organiques simples et des acides gras à longues chaînes (tels que le stéarate). Afin d'enrichir cette souche il était au préalable important de maîtriser la préparation de la solution de Fer (III) (poorly cristalline iron oxide) essentielle à l'élaboration du milieu de culture. Les essais d'enrichissement de cette souche ont été réalisés aux Etats unis (Department of microbiology at UMass, Amherst) par une étudiante de M1. Les cultures ont été réalisées à partir de deux échantillons de la culture d'enrichissement en fermenteur ainsi qu'à partir de l'échantillon brut de cheminée hydrothermale (EXO15E1).

Un milieu contenant du pyruvate et du fer ferrique Fe (III) sous H₂/CO₂ a été réalisé. Ce milieu, décrit lors des travaux de Kashefi et Lovley en 2002 pour la caractérisation de l'*Archaeoglobale Geoglobus ahangari*, a permis l'enrichissement et l'isolement d'organismes

ferroreducteurs à 85°C à partir de l'échantillon de cheminée EXO15E1 (Kashefi et al., 2002). Il n'y a pas eu d'enrichissement à partir des échantillons de la culture en bioréacteur. Après purification par dilution en séries, l'isolat obtenu a été cultivé sur un milieu contenant de la tryptone (afin d'obtenir une densité cellulaire plus importante qu'avec un milieu contenant du pyruvate). Après l'amplification par PCR du gène codant pour l'ADNr16S puis séquençage, l'isolat issu de l'échantillon EXO15E1 s'est avéré être phylogénétiquement affilié au genre *Thermococcus* (Le Roy, 2008). De nouveaux essais d'enrichissement ont donc été réalisés au laboratoire en France à partir d'autres échantillons issus de la culture en bioréacteur ainsi que sur l'échantillon brut EXO15E1, des enrichissements positifs obtenus à partir de l'échantillon brut ont permis d'isoler une autre souche affiliée au genre *Thermococcus* (Figure 26).

Les séquences partielles du gène codant pour l'ARNr16S des souches isolées aux USA (**EXO15FeUS**) et en France (**EXO15FeFr**) sont respectivement proches de celles des espèces *Thermococcus barophilus* et *Thermococcus barossii* (Figure 26) qui sont des espèces hyperthermophiles, anaérobies strictes, chimioorganohétérotrophes dont la croissance est inhibée en présence d'une phase gazeuse composée de H₂. L'utilisation du Fer (III) par la souche isolée en France n'a pas été montrée.

L'ordre des *Thermococcales* est constitué de trois genres : *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Paleococcus* (Takai et al., 2000). Les *Thermococcales* sont très répandues au sein de l'écosystème hydrothermal. Elles sont strictement anaérobies, la plupart sont chimioorganotrophes, et capables d'utiliser des substrats organiques complexes, des sucres, des acides organiques et des acides aminés comme donneurs d'électrons et source de carbone en présence de soufre élémentaire. Leur croissance est inhibée par du dihydrogène dans la phase gazeuse. Les espèces appartenant au genre *Thermococcus* sont phylogénétiquement proches mais peuvent présenter des caractéristiques métaboliques différentes. Certaines ont été décrites comme capables d'utiliser de l'acétate ou du pyruvate telles que *Thermococcus hydrothermalis* (Godfroy et al., 1997), *Thermococcus fumicolans* (Godfroy et al., 1999) mais aussi *Thermococcus barophilus* (Marteinsson et al., 1999). Une espèce autotrophe réduit le CO (Sokolova et al., 2004). La capacité de réduire le fer ferrique (Vargas et al., 1998; Slobodkin et al., 2001) a été montrée chez plusieurs espèces. Cependant, il n'existe actuellement aucune référence bibliographique décrivant une espèce du genre *Thermococcus*, capable de réduire le Fe (III) en présence de pyruvate, sous H₂-CO₂ comme *Geoglobus ahangari*. Ces observations montrent l'existence de capacités métaboliques plus diverses que celles initialement considérées et comme étant les caractéristiques des *Thermococcales*. La caractérisation de ces souches originales est actuellement en cours.

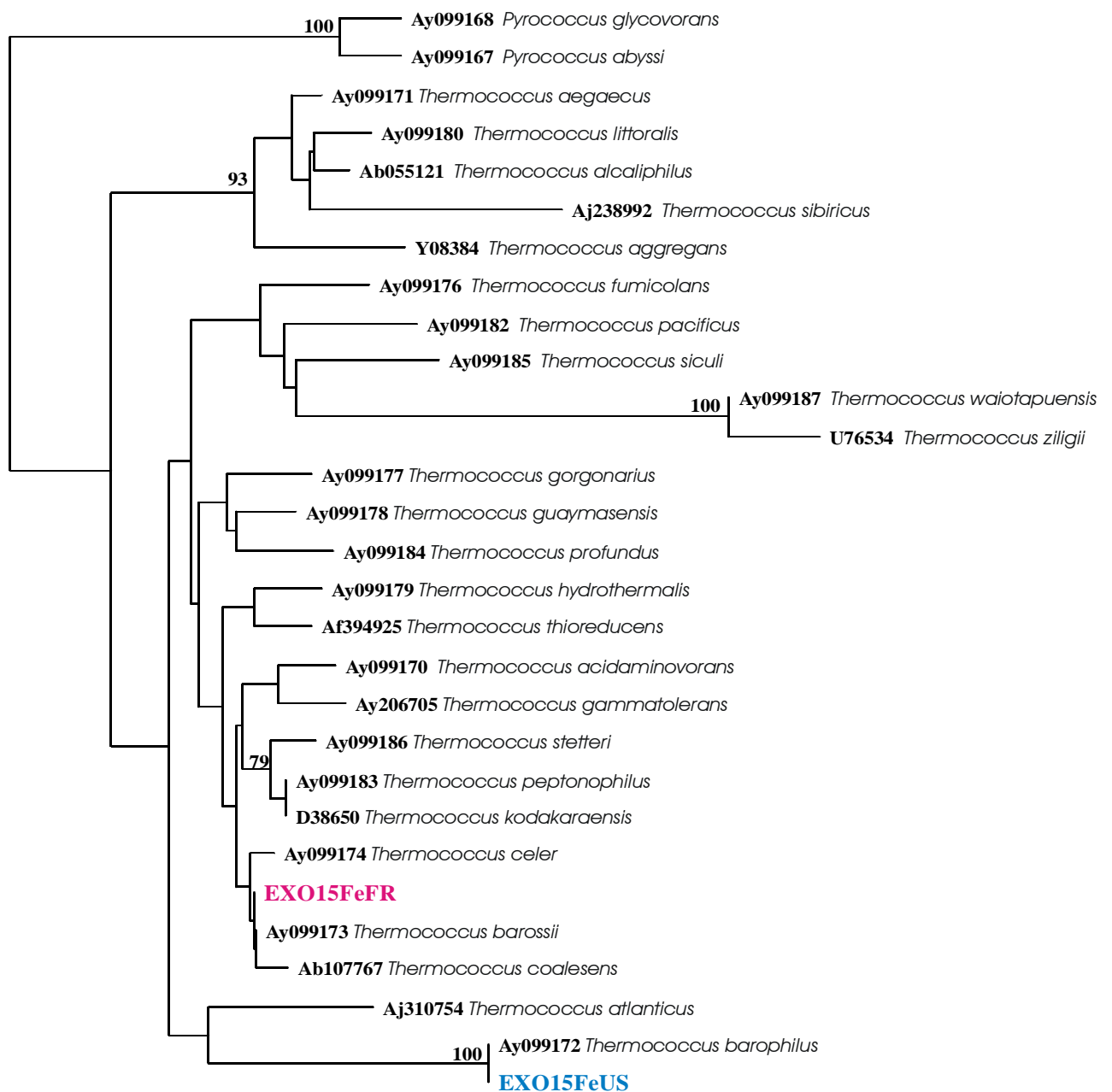


Figure 26: Arbre phylogénétique représentant la position des séquences obtenues à partir de l'échantillon EXO15E1 après les enrichissements et les isolements effectués aux USA EXO15FeUS et en France EXO15FeFR. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Jukes and Cantor.

Lors de ces essais nous avons été confrontés à la difficulté d'obtenir des souches en culture. A l'exception de *Deferribacter sp*, les autres n'ont pu être isolées en culture pure.

Les conditions d'enrichissement en fiole n'étaient-elles pas optimales pour ces souches? Ces souches possèdent-elles des caractéristiques métaboliques et physiologiques très différentes de celles des espèces décrites les plus proches? Dans ce cas des modifications apportées au

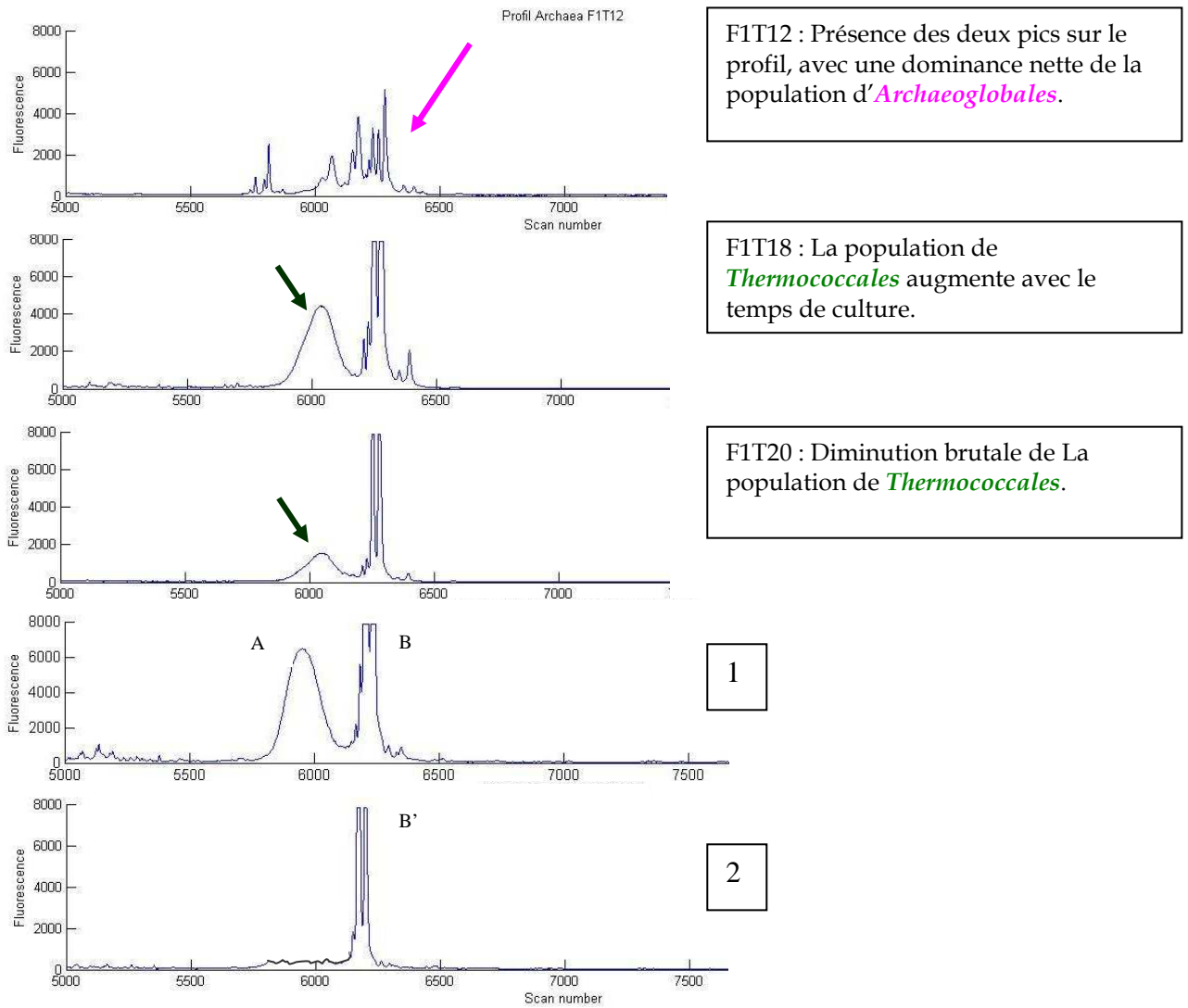
milieu et aux conditions de culture (température, nature des donneurs et accepteurs d'électrons...) pourraient permettre l'enrichissement et l'isolement des souches cultivées dans le bioréacteur. Les difficultés rencontrées pour isoler les différentes espèces peuvent être dues à une mauvaise conservation des échantillons et à leurs utilisations tardives. Des problèmes de conservation avaient précédemment été rencontrés lors des travaux de thèse d'Anne Postec où les échantillons étaient conservés dans du DMSO à -80°C (Postec, 2005).

4. Résultats complémentaires : Etude de la dynamique de la communauté par SSCP

La technique de SSCP permet d'obtenir une empreinte moléculaire des écosystèmes microbiens qui permet de caractériser la diversité d'une communauté microbienne et d'en suivre la dynamique. Dans cette étude nous avons étudié la dynamique des communautés archéennes et bactériennes des cultures d'enrichissement F1 et F2 respectivement. Pour cela nous avons utilisé les clones obtenus après l'analyse de diversité effectuée sur les échantillons de culture. Ces clones ont servi de témoins et ont permis d'attribuer un pic dans un profil à un micro-organisme.

4.1. Dynamique de la communauté archéenne et bactérienne lors des cultures d'enrichissement F1 et F2.

Les données moléculaires ont mis en évidence deux groupes d'Archaea dans la culture F1: des *Thermococcales* et des *Archaeoglobales* et deux groupes de Bacteria dans la culture F2 : des *Deferribacterales* et des *Thermales*. Des clones affiliés aux genres *Thermococcus sp*, *Geoglobus sp*, *Deferribacter sp* et *Vulcanithermus sp* ont été utilisés comme témoins. Les figures 27 et 28 montrent l'évolution des profils obtenus pour les populations archéenne et bactérienne.



F1T12 : Présence des deux pics sur le profil, avec une dominance nette de la population d'*Archaeoglobales*.

F1T18 : La population de *Thermococcales* augmente avec le temps de culture.

F1T20 : Diminution brutale de La population de *Thermococcales*.

1

2

Figure 27: Profils CE-SSCP de la communauté archéenne présente dans la culture d'enrichissement F1 pour les prélèvements F1T12, F1T18 et F1T20. Les témoins *Thermococcus sp* et *Geoglobus sp* sont représentés par les profils 1 et 2.

Les résultats obtenus montrent une population d'*Archeoglobales* qui varie peu au cours du temps, avec une augmentation de l'aire des pics corrélée à l'augmentation de densité cellulaire dans le fermenteur. On remarque cependant une diminution importante et brutale (en 48h) de la population de *Thermococcales*. Une chute de la densité cellulaire avait été notée dans la culture d'enrichissement, cependant ces données de « dynamique » permettent d'émettre une hypothèse sur la cause de cette diminution. Après avoir contrôlé tous les paramètres de culture pouvant expliquer une telle diminution, nous avons émis l'hypothèse de la présence de particules virales dans le fermenteur. Les résultats préliminaires obtenus montrent en effet la présence de ces particules (cf Figure 4 de l'article) mais ne permettent en aucun cas de leur établir un rôle dans la communauté. Des études récentes ont montré la présence de

populations virales associées aux *Thermococcales* (Geslin et al., 2003) mais aucune donnée bibliographique n'a décrit un état lytique pour ces virus. Un seul virus d'Archaea, isolé d'un environnement chaud et acide est connu pour engendrer la lyse de ces cellules hotes (Haring et al., 2005).

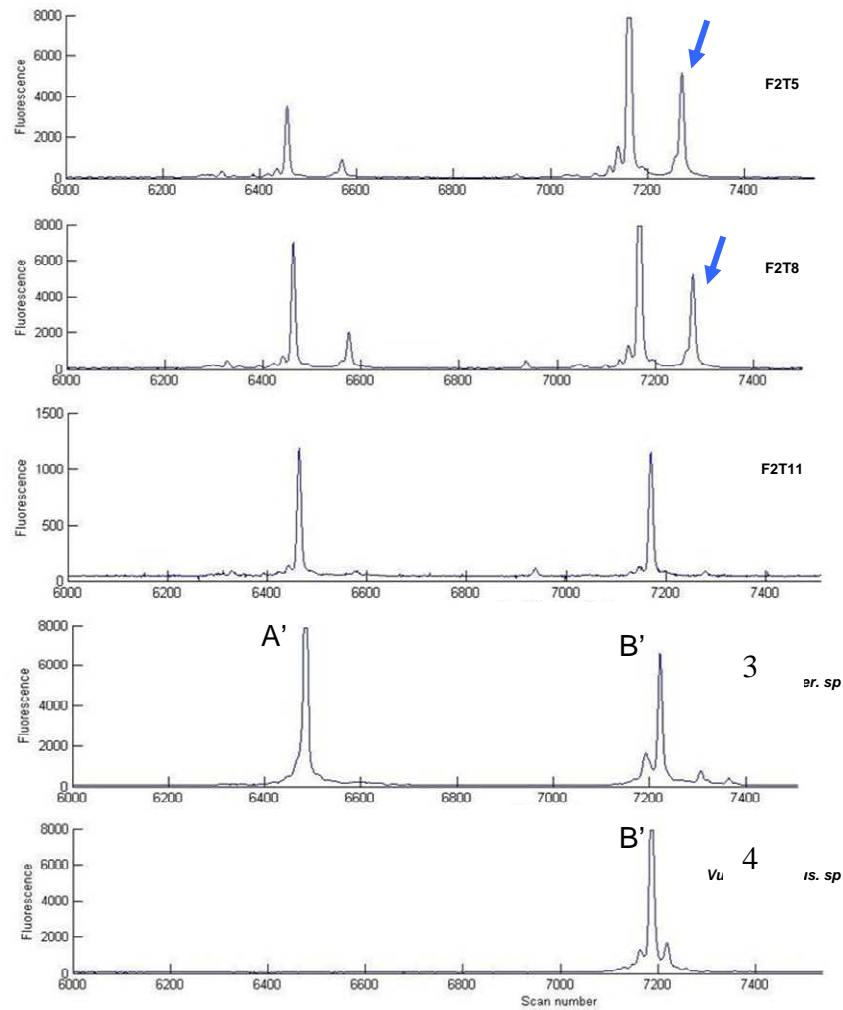


Figure 28: Profils CE-SSCP de la communauté bactérienne présente dans la culture d'enrichissement F1 pour les prélèvements F2T5, F2T8 et F2T11. Les témoins *Deferribacter sp* et *Vulcanithermus sp* sont représentés par les profils 3 et 4.

La dynamique des populations bactériennes a peu évolué avec le temps. Les profils obtenus confirment la présence des deux groupes de Bactéries tout au long de la culture d'enrichissement F2, avec peu ou pas de variations au niveau de l'aire des pics obtenus. Cependant, sur les profils F2T5 et F2T8, un troisième pic (flèche bleue sur la figure 28) est obtenu, il n'est présent sur aucun des profils témoins. Ce pic représente t-il la séquence d'un

troisième groupe de bactéries non détectées lors de l'étude de diversité ? Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'assigner ce pic à une séquence et donc à une espèce de micro-organismes. S'il s'agit d'une troisième espèce bactérienne présente dans le fermenteur, cette technique montre alors son intérêt dans l'étude de diversité en plus de ses apports sur la dynamique des populations présentes dans un échantillon.

Etude 2 : Le fluide hydrothermal utilisé comme base du milieu de culture dans une culture d'enrichissement en bioréacteur

L'utilisation de milieux de culture innovants se rapprochant au mieux des conditions in situ est une approche possible pour accéder aux communautés microbiennes d'un écosystème. L'utilisation du mélange fluide hydrothermal / eau de mer comme base de milieu de culture nous est apparue comme une approche intéressante pour accéder aux communautés microbiennes des sources hydrothermales. Lors de la campagne océanographique MOMARETO 2006 sur la Ride Medio Atlantique, une culture d'enrichissement a été effectuée dans un mini-fermenteur Baby gas-lift (Figure 27) à partir d'un échantillon de cheminée hydrothermale sur un milieu de culture élaboré à partir d'un mélange fluide / eau de mer.



Figure 29: (A) Prélèvement du fluide par Pepito sur la cheminée MO3E1 sur le site Lucky Strike. (B) Bioréacteur « Baby gas-lift » à bord du Pourquoi pas ? lors de la mission Momareto 2006.

Un édifice hydrothermal actif « MO3E1 » a été prélevé sur le site Lucky Strike et a servi d'inoculum pour une culture d'enrichissement dans le bioréacteur Baby gas-lift. La température d'incubation a été fixée à 65°C, le pH à 6,5, le milieu est balayé par de N₂ à 200 ml/h et le taux de dilution du milieu est de 0,04 h⁻¹.

Le milieu de culture utilisé correspond au mélange eau de mer / fluide hydrothermal prélevé (température au point de prélèvement 150°C) sur cette même cheminée, filtré et enrichi par

une solution de matière organique (cf matériel et méthodes). Des observations et des prélèvements ont été réalisés quotidiennement. Les observations microscopiques ont mis en évidence des coques isolées et parfois regroupées en amas. La croissance des micro-organismes n'est devenue significative qu'après réduction du milieu par l'ajout de 0.5 g/L d'HCl Cystéine à 100h de culture (Figure 28).

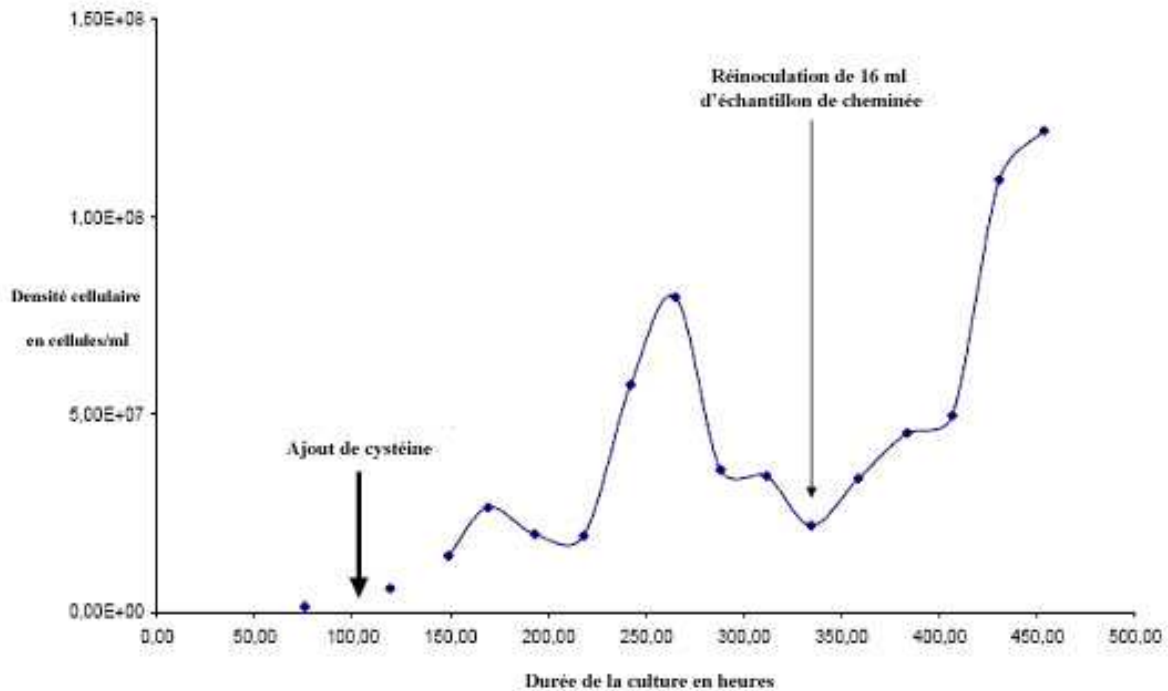


Figure 30: Evolution de la densité cellulaire au cours du temps lors de la culture F3 dans le « Baby » gas-lift

1. Diversité microbienne obtenue pour l'échantillon de cheminée MO3E1

Sur 101 clones séquencés, 33 clones sont affiliés à l'ordre des *Archaeoglobales* avec des séquences (AMO3E1.14) proches à 96% d'*Archaeoglobus veneficus* et d'*Archaeoglobus lithotrophicus* et 68 clones sont affiliés à l'ordre des *Thermococcales* avec des séquences proches à 98% (AMO3E1.3, AMO3E1.8, AMO3E1.27) d'une séquence de *Thermococcus* MZ10 provenant de la biosphère de sub-surface (Summit and Baross, 2001) et 12 proches de *Thermococcus barossii* (AMO3E1.05). Figure 31

L'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S bactérien n'a pu être obtenue malgré plusieurs essais en utilisant différents couples d'amorces. Ceci peut être expliqué par (i) une

densité bactérienne faible dans la cheminée, (ii) une absence d'ADN bactérien dans l'ADN extrait.

2. Analyse de la diversité des micro-organismes dans la culture d'enrichissement F3

Deux échantillons, prélevés 6 et 20 jours après le début de la culture, ont été utilisés pour l'analyse de diversité. Seul le gène codant pour de l'ARNr16S archéen a été amplifié. Aucune amplification du gène codant pour l'ARNr16S bactérien n'a pu être obtenue. Pour les deux prélèvements la totalité des clones (F3T20.12) séquencés (48 par prélèvement) étaient affiliés au genre *Thermococcus* et plus particulièrement au clone *Thermococcus MZ10* avec 99% de similarité.

4. Enrichissement et isolement de la souche affiliée à *Thermococcus*

Deux échantillons prélevés 20 et 27 jours après le début de la culture en bioréacteur ont été utilisés comme inoculum. Ces échantillons T20 et T27 ont été inoculés à 10% sur deux milieux différents : le milieu à base du mélange fluide hydrothermal/eau de mer (F) supplémenté avec 1 g.l⁻¹ de levure, 2 g.l⁻¹ de peptone, 6,05 g.l⁻¹ de PIPES et 10 g.l⁻¹ de soufre et le milieu SMEY(1)P(2) (Postec et al., 2005a). Après incubation une nuit à 85°C les quatre cultures positives ont permis d'effectuer des repiquages et des séries de dilution en vue de l'isolement. Deux séries de dilution en milieu liquide ont été effectuées pour chacun des échantillons puis un isolement sur boîtes suivi d'une série de dilution et d'un nouvel étalement sur boîtes. Les quatre souches isolées ont intégré la collection Ifremer sous les numéros : MO1327, MO1328, MO1329 et MO1330.

L'ADN a été extrait pour chacune des souches puis le gène codant pour l'ARNr16S a été amplifié et séquencé.

Les quatre souches sont identiques et proches phylogénétiquement de *Thermococcus siculi* mais cependant les séquences ne sont pas dans le même groupe que les séquences détectées dans le bioréacteur et les séquences de *Thermococcales* obtenues à partir de l'étude de diversité de l'échantillon brut. Ainsi les conditions d'enrichissement et d'isolement utilisées (forte concentration en matière organique, et température de 85°C, présence de soufre colloïdal S⁰) proches des conditions optimales de la plupart des *Thermococcales* décrites n'ont pas permis d'isoler les espèces présentes dans le bioréacteur, malgré l'utilisation du

mélange fluide hydrothermal / eau de mer. L'espèce cultivée dans le bioréacteur à 60°C, sans S0 et avec une concentration en matière organique faible (0,3 g/l) pourrait présenter des caractéristiques différentes de celles de la plupart des *Thermococcales*. Leur isolement en utilisant des conditions similaires (concentration en matière organique et température) à celles de la culture en bioréacteur est en cours.

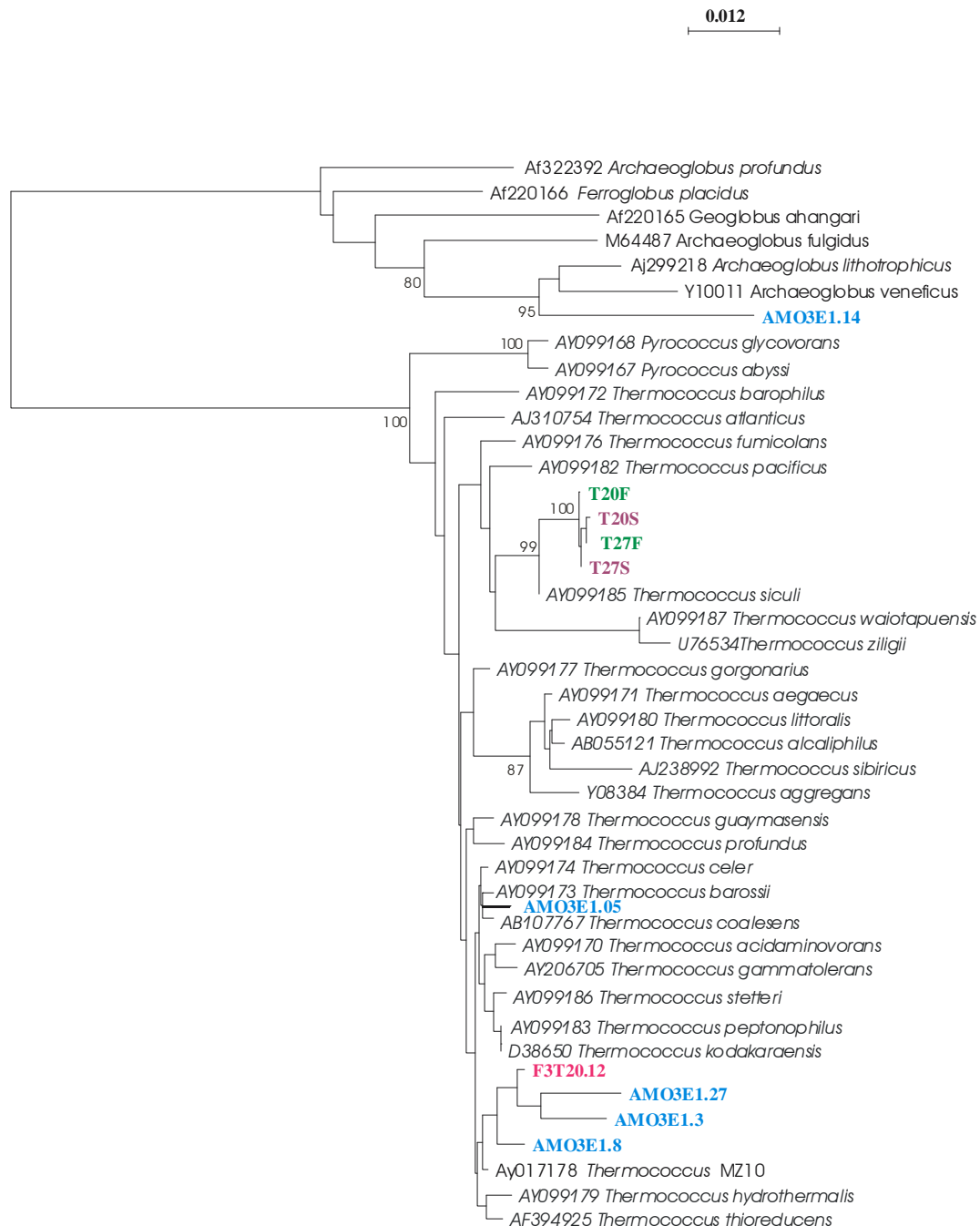


Figure 31: Arbre phylogénétique représentant la position des séquences archéennes de l'échantillon brut **MO3E1**, et des isolats **T20F** et **T27F** isolés sur le milieu avec le mélange fluide hydrothermal/eau de mer, des isolats **T20S** et **T27S** isolés sur milieu SME obtenus à partir des échantillons issus de la culture en bioréacteur et de la séquence obtenue à partir des échantillons prélevés lors de la culture d'enrichissement (**F3T20.12**). L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Jukes and Cantor.

Lors de cette culture d'enrichissement le mélange fluide hydrothermal / eau de mer prélevé *in situ*, a été utilisé comme base du milieu de culture et enrichi en matière organique. Nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un milieu de culture issu directement de l'environnement pourrait favoriser la croissance de micro-organismes incultivés jusqu'alors sur les milieux classiquement utilisés.

Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence de nouveaux micro-organismes en culture. Néanmoins cet essai a montré que des cultures d'enrichissement en bioréacteur sont possibles à bord, qu'il est également possible de les effectuer sur le long terme. De plus, malgré des conditions de culture éloignées des conditions optimales de culture des *Thermococcales*, elles sont de nouveau mises en évidence dans cette culture d'enrichissement. Il serait intéressant d'utiliser des bioréacteurs pressurisés, de miniaturiser le système de culture afin de mettre en œuvre des cultures d'enrichissement simultanées à partir d'un seul échantillon de départ et dans des conditions de cultures différentes (variations des conditions de température, pH, mélange gazeux, concentration en matière organique, donneurs et accepteurs d'électrons etc...).

Le bioréacteur gas lift s'avère donc être un outil prometteur pour l'étude de communautés microbiennes cultivables, correspondant à une fraction de la communauté naturelle en fonction des conditions de culture expérimentales appliquées. Dans nos cas, l'utilisation de faibles voire très faibles concentrations en nutriments, d'un balayage gazeux constitués de gaz présents en milieu hydrothermal, du fluide hydrothermal comme base du milieu de culture représentent un pas important vers des conditions de culture de plus en plus proches des conditions *in situ*.

Conclusions

Les sources hydrothermales marines profondes sont des écosystèmes où règnent conjointement des conditions de température, de pH, de pression hydrostatique, de concentrations en métaux lourds et de radiations ionisantes les plus extrêmes. Les gradients thermiques et géochimiques abrupts qui résultent du mélange entre les fluides hydrothermaux surchauffés et l'eau de mer ambiante définissent une multitude de micro-niches propices au développement de communautés microbiennes très diversifiées. Ainsi des micro-organismes psychrophiles, mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles prospèrent dans cet écosystème en utilisant les abondantes sources organiques et inorganiques d'énergie et de carbone disponibles. Ces micro-organismes sont présents sous forme libre, forment des tapis ou des biofilms sur les sédiments, les surfaces ou les animaux. D'autres sont des symbiotes obligatoires associés aux invertébrés. Au cours des 20 dernières années, les microbiologistes ont obtenu des données conséquentes concernant la diversité et la physiologie des micro-organismes associées à cet écosystème unique.

De façon traditionnelle la diversité microbienne a été estimée par des approches culturelles ; cependant recréer les conditions physico-chimiques d'un écosystème en culture est difficile et conduit inévitablement à une vision biaisée de sa diversité. Ceci est d'autant plus vrai en ce qui concerne l'écosystème hydrothermal pour lequel le développement de milieux de cultures appropriés et la reconstitution des conditions environnementales sont extrêmement difficiles. Néanmoins, les méthodes culturelles restent cruciales pour accéder et comprendre la diversité physiologique des organismes de cet écosystème et ont conduit à l'isolement et à la description d'un nombre important de micro-organismes nouveaux. Les micro-organismes décrits présentent une étonnante diversité de métabolisme (donneur et accepteur d'électrons utilisés ; caractéristiques physiologiques : optimum de température, de pH, de pression, source de carbone).

Les méthodes moléculaires d'écologie microbienne, ont révélé une extraordinaire diversité microbienne au sein de cet écosystème. Dans la plupart des cas, ces inventaires moléculaires basés sur l'étude de la diversité des gènes codant pour les ARNr16S (Reysenbach et al., 2000; Takai et al., 2001; Alain et al., 2002c; Schrenk et al., 2003; Alain et al., 2004; Nercessian et al., 2005a; Takai et al., 2008) et plus rarement sur l'étude de diversité de gènes fonctionnels (Dhillon et al., 2005; Nercessian et al., 2005b) ont révélé la présence de nombreuses lignées pour lesquelles il n'existe pour l'instant aucun représentant cultivé.

Au cours de ces travaux de thèse, la diversité métabolique des micro-organismes des écosystèmes hydrothermaux océaniques a été étudiée en deux parties distinctes :

- La présence et l'activité de bactéries impliquées dans l'oxydation anaérobie de l'ammonium a été recherchée par l'utilisation coordonnée de méthodes moléculaires et de mesures d'activité.

- La diversité microbienne d'échantillons de cheminée hydrothermale a été abordée grâce à l'utilisation coordonnée d'une méthode de culture innovante et de méthodes moléculaires.

Oxydation anaérobie de l'ammonium dans l'écosystème hydrothermal :

En compilant les informations disponibles sur les espèces microbiennes décrites en milieu hydrothermal, on a notamment pu noter l'absence de micro-organismes effectuant l'oxydation anaérobie de l'ammonium à haute température. Ainsi le cycle de l'azote ne fonctionnerait pas à des températures supérieures à 60°C, sauf bien sûr si on envisage la présence et l'activité de bactéries anammox. L'utilisation combinée de techniques moléculaires et de mesures d'activités ont conduit à mettre en évidence la présence de cette activité dans plusieurs compartiments microbiens de l'écosystème hydrothermal le long du gradient de température et de compléter nos connaissances sur le cycle de l'azote. Ainsi des micro-organismes anammox ont été détectés dans la partie « froide » de l'écosystème, associé aux invertébrés (modioles) et à des tapis microbiens et surtout dans des échantillons du pôle « chaud » de l'écosystème. Grâce à des amorces spécifiques, une importante diversité de séquences a été détectée avec notamment la mise en évidence d'un nouveau clade au sein des bactéries anammox. La présence de ces micro-organismes a été confirmée par la détection de lipides laddéranes (spécifiques des *Planctomycètes* anammox) mais également par des mesures d'activité dans les édifices hydrothermaux actifs : activités mesurées à 60 et 85°C et comparables aux activités mesurées dans d'autres écosystèmes marins.

Afin de compléter les résultats acquis dans cette étude, il apparaît utile de réaliser de nouveaux inventaires moléculaires sur des échantillons issus d'autres sites hydrothermaux mais surtout d'accéder à ces micro-organismes en culture. L'activité à 85°C mise en évidence sur l'échantillon de cheminée MOM07 (site Rainbow) ainsi que la présence d'une séquence de clone issue de cet échantillon dans le nouveau clade de bactéries anammox, en font un bon candidat pour la réalisation d'une culture d'enrichissement en bioréacteur à haute température.

Diversité et culture de communautés microbiennes d'échantillons de cheminée hydrothermale :

La deuxième partie de cette étude, basée à la fois sur des techniques moléculaires et des techniques culturales avait pour objectif d'étudier la diversité microbienne et a permis d'identifier des populations microbiennes associées à l'échantillon de cheminée hydrothermale. Les résultats obtenus pour l'étude de diversité de la cheminée du site TAG ont montré une diversité microbienne relativement faible comparé à d'autres études (Reysenbach et al., 2000; Takai et al., 2001; Alain et al., 2002c; Nercessian et al., 2005a; Page et al., 2008). En effet la totalité des séquences archéennes détectées sont affiliées au genre *Thermococcus*. En ce qui concerne la diversité bactérienne, la majorité des séquences obtenus sont affiliées aux *Protéobactéries* et plus particulièrement à des séquences d'incultivées au sein des *Epsilon*, *Alpha* et *Delta Protéobacteria* avec notamment des séquences proches d'espèces impliquées dans le métabolisme du soufre. Concernant l'étude de diversité de l'échantillon de la cheminée du site Lucky Strike, seules des séquences archéennes ont été mises en évidence et affiliées à deux phylotypes : les *Thermococcales* et les *Archaeoglobales*.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la faible diversité archéenne mise en évidence pour deux édifices hydrothermaux géographiquement distincts :

- les techniques d'études à savoir les biais liés aux extractions d'ADN, aux amplifications des gènes codant pour l'ARNr16S. De récentes études ont notamment montré des biais liés aux amorces utilisées (Teske and Sorensen, 2007). Le «design» de nouvelles amorces ainsi que l'utilisation systématique de combinaison de différents «primers» devraient permettre une mise en évidence d'une plus grande diversité de micro-organismes au sein des écosystèmes.

- L'âge et la structure minérale de la cheminée peuvent également expliquer la faible diversité obtenue. Bien qu'il existe peu de données sur le suivi temporel des communautés microbiennes en fonction de l'âge de la cheminée et donc de la minéralogie, deux études récentes (Page et al., 2008; Takai et al., 2008) soulignent la différence de composition des communautés microbiennes qu'elles soient associées à des cheminées «immatures» (jeunes) ou «matures» (plus anciennes). A des cheminées anciennes sont associées des communautés microbiennes plus complexes que pour des édifices hydrothermaux jeunes (Takai et al., 2008). Dans notre cas, l'analyse par diffraction X de l'échantillon de cheminée du site TAG montre que celle-ci est vraisemblablement une cheminée «jeune» car constituée en grande majorité d'anhydrite. De la même façon, l'édifice prélevé sur le site Lucky Strike est jeune,

notre échantillon a été prélevé en août 2006 (MO3E1), et cette même cheminée avait été prélevée un an auparavant lors de la mission Exomar. Ces édifices actifs constituent alors des habitats microbiens peu diversifiés.

Cet inventaire moléculaire procure des informations sur les micro-organismes présents au niveau de l'édifice hydrothermal à un instant donné. Les caractérisations réalisées ne permettent cependant pas d'avoir accès aux propriétés phénotypiques des micro-organismes détectés. Dès lors, la culture des micro-organismes est indispensable pour caractériser les métabolismes des micro-organismes.

Des cultures d'enrichissement en bioréacteur ont donc été effectuées à partir de ces échantillons de cheminée en utilisant des conditions de culture proches de celles présentes dans l'environnement : milieu oligotrophe, un balayage gazeux constitué d'H₂ et de CO₂, un milieu de culture composé du mélange fluide hydrothermal / eau de mer. De plus, l'effet des variations de la température, de la présence ou non de soufre colloïdal ont été testées sur la composition des communautés microbiennes cultivées.

Un résultat important et intéressant, obtenu lors des cultures d'enrichissement montre qu'exceptées les espèces affiliées au genre *Thermococcus* toutes les espèces cultivées dans les cultures d'enrichissement n'ont pas été détectées dans l'étude moléculaire de diversité des échantillons de cheminée, ceci confirme que les approches culturelles et moléculaires sont des outils complémentaires pour évaluer la diversité microbienne et notamment la recherche de souches détectées moléculairement.

Les séquences de micro-organismes hyperthermophiles hétérotrophes du genre *Thermococcus*, sont fortement représentées dans les échantillons de cheminée et dans les cultures d'enrichissement. Les *Thermococcales* qui sont certainement les micro-organismes parmi les plus cultivés venant de l'écosystème hydrothermal sont fréquemment retrouvés dans les inventaires moléculaires d'échantillons prélevés sur des sites hydrothermaux de la dorsale médio-atlantique (Postec et al., 2005a), du Bassin de Lau (Takai et al., 2008), mais aussi à partir de colonisateurs *in situ* (Reysenbach et al., 2000; Nercessian et al., 2003 ; McCliment et al., 2006). La plupart des micro-organismes de l'ordre des *Thermococcales* peuvent se développer dans de larges gammes de température (50 à 103°C), de pH (3 à 9), de salinité (0.8 à 8 %) et utiliser diverses sources de carbone (Zillig and Reysenbach, 2001 ; Sokolova et al., 2004) avec des vitesses de croissance parfois élevées (Postec et al., 2005a). Grâce à leur extraordinaire capacité d'adaptation, ces micro-organismes sont retrouvés dans de nombreux écosystèmes chauds tels que les sources hydrothermales terrestres, côtières et les biosphères

souterraines profondes (Takai and Horikoshi, 1999a; Roussel et al., 2008). Certains peuvent supporter la présence d'oxygène ou se développer en présence de fortes doses d'irradiation gamma ou fortes concentrations en métaux lourds (Zillig and Reysenbach, 2001; Jolivet et al., 2003). Des enrichissements de *Thermococcales* à partir d'échantillons de particules récupérées dans des pièges au niveau de la Dorsale Medio-Atlantique ont montré la capacité de ces micro-organismes à être enrichis et ce même après un séjour prolongé dans une eau de mer froide et oxygénée (Lesongeur et al., soumis). Dans cette étude des *Thermococcales* ont pu être cultivées avec de faibles concentrations en matière organique et en présence d'H₂. C'est un inhibiteur de la croissance pour toutes les espèces décrites. Lors des essais d'isolement de l'*Archaeoglobale Geoglobus ahangari* détectée dans les cultures en bioréacteurs, c'est une *Thermococcale* qui a été isolée, elle est capable de réduire le Fe (III) en présence de pyruvate, sous H₂-CO₂. Toutes ces observations laissent présager l'existence au sein des *Thermococcales* de compétences physiologiques et métaboliques plus diverses que celles initialement considérées. Leurs diversités phénotypiques importantes, leur présence sur des édifices hydrothermaux jeunes, leur capacité à se maintenir dans des environnements hostiles, leur vitesse de croissance rapide leur confèrent un avantage écologique majeur et en font probablement des espèces pionnières dans la colonisation des environnements hydrothermaux.

La présence du mélange gazeux H₂/CO₂, lors des cultures F1 et F2, a permis le développement en co-culture avec les *Thermococcales* à 85°C d'*Archaea* hyperthermophiles affiliées au genre *Geoglobus*. Une souche du genre *Aeropyrum* a également été détectée en tout début de culture. Ensuite, le changement des conditions de culture (diminution de la température et suppression du soufre colloïdal dans le milieu), a permis d'étendre la diversité des micro-organismes cultivables de la cheminée étudiée, avec notamment l'apparition de souches bactériennes affiliées aux genres *Vulcanithermus* et *Deferribacter*.

Il n'a cependant pas été possible d'isoler en culture pures certaines des souches détectées dans les cultures en bioréacteur. La culture de communautés montre là encore son importance pour la mise en évidence de nouvelles souches non cultivables en culture pure. Au sein des communautés cultivées des interactions s'établissent entre les populations microbiennes, la croissance d'une population, permettant le développement d'une autre (comme cela a certainement lieu dans leur environnement) grâce la transformation des constituants du milieu, par des échanges de métabolites, ou grâce à l'utilisation par une population de composés qui pourrait être toxiques pour d'autres.

L'étude de la diversité microbienne par la culture de communauté permet ainsi d'étudier l'influence des variations des paramètres environnementaux, de cultiver des souches non purifiables, de mettre en évidence des interactions entre espèces.

En conclusion les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'améliorer notre connaissance de la diversité et de la fonction des micro-organismes des édifices hydrothermaux actifs :

- par la mise en évidence pour la première fois, dans les édifices hydrothermaux et plus largement au niveau de l'écosystème hydrothermal de bactéries actives réalisant la réaction d'oxydation anaérobie de l'ammonium.
- par la mise en évidence d'une probable diversité métabolique encore à découvrir au sein de groupes de micro-organismes connus.
- par la confirmation que la culture de communautés microbiennes en bioréacteur est une approche prometteuse pour identifier les interactions entre espèces et pour accéder en culture à des espèces non cultivables en culture pure.

Nos travaux ont également montré que les paramètres environnementaux fluctuants de l'écosystème hydrothermal ont une influence sur la structure des communautés microbiennes qui colonisent les édifices hydrothermaux actifs. Les variations temporelles et spatiales des conditions physico-chimiques qui prévalent dans les édifices hydrothermaux actifs, le long du gradient de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer, vont conditionner la structure et l'activité des communautés microbiennes qu'ils hébergent.

Références bibliographiques

- Achtman, M., and Wagner, M. (2008).** Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Micro* **6**: 431-440.
- Alain, K., Marteinsson, V.T., Miroshnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Prieur, D., and Birrien, J.L. (2002a).** *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1331-1339.
- Alain, K., Postec, A., Grinsard, E., Lesongeur, F., Prieur, D., and Godfroy, A. (soumis).** *Thermodesulfatator atlanticus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent
- Alain, K., Zbinden, M., Bris, N.L., Lesongeur, F., Quérellou, J., Gaill, F., and Cambon-Bonavita., M.-A. (2004).** Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol* **6**: 227-241.
- Alain, K., Querellou, J., Lesongeur, F., Pignet, P., Crassous, P., Raguene, G. et al. (2002b).** *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, S.K. et al. (2002c).** Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 463-476.
- Alain, K., Pignet, P., Zbinden, M., Quillevere, M., Duchiron, F., Donval, J.P. et al. (2002d).** *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1621-1628.
- Alain, K., Rolland, S., Crassous, P., Lesongeur, F., Zbinden, M., LeGall, 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.
- Alazard, D., Dukan, S., Urios, A., Verhe, F., Bouabida, N., Morel, F. et al. (2003).** *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 173-178.
- Alfredsson, G.A., Kristjansson, J.K., Hjorleifsdottir, S., and Stetter, K.O. (1988).** *Rhodothermus marinus*, gen. nov., a Thermophilic, Halophilic Bacterium from Submarine Hot Spring in Iceland. *J Gen Microbiol* **134**: 299-306.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews* **59**: 143-169.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990).** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.
- An, S., Gardner, W.S., and Kana, T. (2001).** Simultaneous Measurement of Denitrification and Nitrogen Fixation Using Isotope Pairing with Membrane Inlet Mass Spectrometry Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1171-1178.
- Antoine, E., Guezennec, J., Meunier, J.R., Lesongeur, F., and Barbier, G. (1995).** Isolation and characterization of extremely thermophilic archaeobacteria related to the genus *Thermococcus* from deep-sea hydrothermal Guayamas basin. *Curr Microbiol* **31**: 186-192.
- Antoine, E., Cilia, V., Meunier, J.-R., Guezennec, J., Lesongeur, F., and Barbier, G. (1997).** *Thermosiphon melanesiensis* sp. nov., a new thermophilic

- anaerobic bacterium belonging to the the *Thermotogales*, isolated from deep-sea hydrothermal vent in the southern Pacific ocean. *Int. J. System. Bacteriol.* **47**: 1118-1123.
- Arab, H., Volker, H., and Thomm, M. (2000).** *Thermococcus aegaicus* sp nov and *Staphylothermus hellenicus* sp nov., two novel hyperthermophilic archaea isolated from geothermally heated vents off Palaeochori Bay, Milos, Greece. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 2101-2108.
- Arrigo, K.R. (2005).** Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* **437**: 349-355.
- Atomi, H., T. Fukui, T. Kanai, Morikawa, M., and Imanaka, T. (2004).** Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archae* **1**: 263-267.
- Auchtung, T.A., Takacs-Vesbach, C.D., and Cavanaugh, C.M. (2006).** 16S rRNA Phylogenetic Investigation of the Candidate Division "Korarchaeota". *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5077-5082.
- Audiffren, C., Cayol, J.-L., Joulian, C., Casalot, L., Thomas, P., Garcia, J.-L., and Ollivier, B. (2003).** *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1585-1590.
- Barbier, G., Godfroy, A., Meunier, J.-R., Quérellou, J., Cambon, M.-A., Lesongeur, F. et al. (1999).** *Pyrococcus glycovorans*, sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from the East Pacific Rise. *Int J System Bacteriol* **49**: 1829-1837.
- Baross, J.A., and J.D., D. (1985).** The role of bacteria in the ecology of black-smoker environment. *Biol. Soc. Wash. Bull.* **6**: 355-371.
- Baross, J.A., Lilley, M.D., and Gordon, L.I. (1982).** Is the CH₄, H₂ and CO venting from submarine hydrothermal system produced by thermophilic bacteria? *Nature* **298**: 366-368.
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., and Stetter, K.O. (1997).** *Pyrolobus fumarii*, ge. nov., sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**: 14-21.
- Boumann, H.A., Hopmans, E.C., van de Leemput, I., Op den Camp, H.J.M., 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.
- Brandes, J.A., Devol, A.H., and Deutsch, C. (2007).** New Developments in the Marine Nitrogen Cycle. *Chem. Rev.* **107**: 577-589.
- Brault, M. (1984).** Biogéochimie de la matière organique dans les environnements hydrothermaux le long de la dorsale Est-Pacifique, à 13°N. *Thèse de troisième cycle-Université Pierre et Marie Curie, Paris*: 168p.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6257-6270.
- Brisbarre, N., Fardeau, M.-L., Cuff, V., Cayol, J.-L., Barbier, G., Cilia, V. et al. (2003).** *Clostridium caminithermale* sp. nov., a slightly halophilic and moderately thermophilic bacterium isolated from an Atlantic deep-sea hydrothermal chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1043-1049.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008).** Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Micro* **6**: 245-252.
- Brochier, C., and Philippe, H. (2002).** A non-hyperthermophilic ancestor for Bacteria. *Nature* **417**: 244.
- Brock, T.D., and Freeze, H. (1969).** *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non

- sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**: 289-297.
- Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T., and Weiss, R.L. (1972).** *Sulfolobus* : a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archive of Microbiology* **84**: 54-68.
- Broda, E. (1977).** Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol* **17**: 491-493.
- Burggraf, S., Jannasch, H., Nicolaus, B., and Stetter, K.O. (1990).** *Archeoglobus profundus* sp.nov., Represents a New Species within the Sulfate reducing archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**: 24-28.
- Burggraf, S., Stetter, K.O., Rouvire, P., and Woese, C.R. (1991).** *Methanopyrus kandleri*: An archeal methanogen unrelated to all other known methanogens. *System. Appl. Microbiol.* **14**: 346-351.
- Cambon-Bonavita, M.-A., Lesongeur, F., Pignet, P., Wery, N., Lambert, C., Godfroy, A. et al. (2003).** *Thermococcus atlanticus* sp.nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **7**: 101-109.
- Campbell, A.C., Palmer, M.R., Klinkhammer, G.P., Bowers, T.S., Edmond, J.M., Lawrence, J.R. et al. (1988).** Chemistry of hot springs on the Mid-Atlantic Ridge. *Nature* **335**: 514-519.
- Campbell, J.B., Jeanthon, C., Kostka, J.E., Luther, G.W., and Cary, S.C. (2001).** Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the epsilon subdivision of the *Proteobacteria* enriched from *Alvinella pompejana* and deep sea hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4566-4572.
- Canganella, F., and Jones, W.J. (1994).** Microbial Characterization of Thermophilic Archaea Isolated from the Guaymas Basin Hydrothermal Vent. *Curr Microbiol* **28**: 299-306.
- Canganella, F., Jones, W.J., Gambacorta, A., and Antranikian, G. (1998).** *Thermococcus guaymasensis* sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic archaea isolated from the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *Int. J. System. Bacteriol.* **48**: 1181-1185.
- Canganella, F., Gonzalez, J.M., Yanagibayashi, M., Kato, C., and Horikoshi, K. (1997).** Pressure and temperature effects on growth and viability of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus peptonophilus*. *Archive of Microbiology* **168**: 1-7.
- Cavanaugh, C.M., Gardiner, S.L., Jones, M.L., Jannasch, H.W., and Waterbury, J.B. (1981).** Prokaryotic cells in the hydrothermal tube worm *Riftia pachyptila*: possible chemoautotrophic symbionts. *Science* **213**: 340-342.
- Chachkhiani, M., Dabert, P., Abzianidze, T., Partskhaladze, G., Tsiklauri, L., Dudaury, T., and Godon, J.J. (2004).** 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresour. Technol.* **93**: 227-232.
- Charlou, J.L. (1997).** *Eos Trans* **78**, **46**, **F831**.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., 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[deg]14'N, MAR). *Chemical Geology* **191**: 345-359.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Douville, E., Jean-Baptiste, P., Radford-Knoery, J., Fouquet, Y. et al. (2000).** Compared geochemical signatures and the evolution of Menez Gwen (37°50'N) and Lucky Strike (37°17'N) hydrothermal fluids, south of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge. *Chemical Geology* **171**: 49-75.
- Chevaldonné, P., and Godfroy, A. (1997).** Enumeration of microorganisms from deep-sea hydrothermal chimney samples. *FEMS Microbiol Lett* **146**: 211-216.
- Chevaldonné, P., Desbruyères, D., and Le Haitre, M. (1991).** Time-series of

- temperature from three deep-sea hydrothermal vent sites. *Deep-Sea Research I* **38**: 1417-1430.
- Codispoti, L., Friederich, G., Packard, T., Glover, H., Kelly, P., Spinrad, R. et al. (1986).** High Nitrite Levels off Northern Peru: A Signal of Instability in the Marine Denitrification Rate. *Science* **233**: 1200-1202.
- Codispoti, L.A., and Christensen, J.P. (1985).** Nitrification, denitrification and nitrous oxide cycling in the eastern tropical South Pacific ocean. *Mar Chem* **16**: 277-300.
- Comita, P.B., and Gagosian, R.B. (1983).** Membrane lipid from deep-sea hydrothermal vents methanogen : a new macrocyclic glycerol diether. *Science* **222**: 1329-1331.
- Corbari, L., Cambon-Bonavita, M.-A., Long, G.J., Grandjean, F., Zbinden, M., Gaill, F., and Compère, P. (2008).** Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Biogeosc* **5**: 1295-1310.
- Corliss, J.B., and Ballard, R.D. (1977).** Oases of life in the cold abyss. *National Geographic* **152**: 440-453.
- Cornel, R.M., and Schwertmann, U. (2003).** The Iron oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. *Wiley-VCH & Weinheim*.
- Corre, E., Reysenbach, A.L., and Prieur, D. (2001).** Epsilon-proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol. letter* **205**: 329-335.
- Crapart, S., Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Thomas, P., Sery, C., Ollivier, B., and Combet-Blanc, Y. (2007).** *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 287-292.
- Crepeau, V. (2007).** Recherche de micro-organismes anammox dans des écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds. *Master Report*.
- Dalsgaard, T., Canfield, D., Petersen, J., Thamdrup, B., and Acuna-Gonzalez, J. (2003).** N² production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* **422**: 606-608.
- Delbes, C., Moletta, R., and Godon, J.J. (2000).** Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol* **2**: 506-515.
- Deming, J.W. (1986).** The biotechnological future for newly described, extremely thermophilic bacteria. *Microbial Ecol* **12**: 111-112.
- Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J.C., Colaço, A., Comtet, T., Crassous, P. et al. (2001).** Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep Sea Research Part I* **48**: 1325-1346.
- Devol, A.H. (2003).** Solution to a marine mystery. *Nature* **422**: 575-576.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003).** Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2765-2772.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4592-4601.
- Dirmeier, R., Keller, M., Hafenbradl, D., Braun, F.J., Rachel, R., Burggraf, S., and Stetter, K.O. (1998).** *Thermococcus acidaminovorans* sp. nov., a new hyperthermophilic alkaliphilic archaeon growing on amino acids. *Extremophiles* **2**: 109-114.
- Donval, J.P., Charlou, J.L., Douville, E., Knoery, J., Fouquet, Y., Poncevera, E. et al. (1997).** Flores scientific party *EosTrans* **78, 46, 832**.

- Douville, E., Charlou, J.L., Oelkers, E.H., Biennu, P., Jove Colon, C.F., Donval, J.P. 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. *Chem Geol* **184**: 37-48.
- Duffaud, G.D., dHennezel, O.B., Peek, A.S., Reysenbach, A.L., and Kelly, R.M. (1998).** Isolation and characterization of *Thermococcus barossii*, sp. nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a hydrothermal vent flange formation. *Syst Appl Microbiol* **21**: 40-49.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **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. *Env Microbiol* **8**: 1441-1447.
- Durand, P., reysenbach, A.-L., Prieur, D., and Pace, N. (1993).** Isolation and characterization of *Thiobacillus hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic obligately chemolithotrophic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Fiji Basin. *Arch. Microbiol.* **159**: 1502-150639-150644.
- Edwards, K.J., Rogers, D.R., Wirsén, C.O., and McCollom, T.M. (2003).** Isolation and Characterization of Novel Psychrophilic, Neutrophilic, Fe-Oxidizing, Chemolithoautotrophic {alpha}- and {gamma}-Proteobacteria from the Deep Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2906-2913.
- 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, France.**
- Erauso, G., Prieur, D., Godfroy, A., and Raguénès, G. (1995)** Plate cultivation techniques for strictly anaerobic, thermophilic, sulfur-metabolizing archae. In *Archaea: a laboratory manual. Thermophiles*. Robb, F.T., and Place, A.R. (eds): Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 25-29.
- Erauso, G., Reysenbach, A.L., Godfroy, A., Meunier, J.R., Crump, B., Partensky, F. et al. (1993).** *Pyrococcus abyssi* sp. nov. , a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Archive of Microbiology* **160**: 338-349.
- Falkowski, P.G., Barber, R.T., and Smetacek, V. (1998).** Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* **281**: 200-206.
- Fardeau, M.-L., Salinas, M.B., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Verhe, F., Cayol, J.-L. et al. (2004).** Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 467-474.
- Felbeck, H. (1981).** Chemoautotrophic potential of the hydrothermal tube worm *Riftia pachyptila* (vestimentifera). *Science* **213**: 336-338.
- Ferris, M.J., Ruffroberts, A.L., Kocczynski, E.D., Bateson, M.M., and Ward, D.M. (1996).** Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1045-1050.

- Fiala, G., and Stetter, K.O. (1986).** *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* **145**: 56-61.
- Fiala, G., Stetter, K.O., Jannasch, H.W., Langworthy, T.A., and Madon, J. (1986).** *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C. *System. Appl. Microbiol.* **8**: 106-113.
- Fouquet, Y. (1997).** Where are the large hydrothermal deposits in the oceans? *Phil Trans R Soc* **355**: 427-441.
- 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. *Mar. Geol.* **84**: 145-178.
- Francis, A., Beman, J., and Kuypers, M. (2007).** New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME* **1**: 19-27.
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., and Oakley, B.B. (2005).** Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *PNAS* **102**: 14683-14688.
- Fuerst, J.A. (2005).** Intracellular Compartmentation in Planctomycetes. *Annu. Rev. Microbiol* **59**: 299-328.
- Furtado, A.L.D., and Casper., P. (2000).** Different methods for extracting bacteria from freshwater sediment and a simple method to measure bacterial production in sediment samples. *J Microbiol Meth* **41**: 249-257.
- Galtier, N., and Lobry, J.R. (1997).** Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. *J Mol Evol* **44**: 632-636.
- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996).** Seaview and Phylowin two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 543-548.
- Gartner, A., Wiese, J., and Imhoff, J.F. (2008).** *Amphritea atlantica* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium from the Logatchev hydrothermal vent field. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 34-39.
- Geslin, C., Le Romancer, M., Erauso, G., Gaillard, M., Perrot, G., and Prieur, D. (2003).** PAV1, the first Virus-Like particle isolated from a hyperthermophilic Euryarchaeote, *Pyrococcus abyssi*. *J. Bacteriol.* **185**: 3888-3894.
- Godfroy, A., Raven, N.D.H., and Sharp, R.J. (2000).** Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 127-132.
- Godfroy, A., Postec, A., and Raven, N. (2006) Growth of hyperthermophilic microorganisms for physiological and nutritional studies. In *Methods in Microbiology, Extremophiles*. Rainey, F.A., and Oren, A. (eds). Oxford, England: Academic Press.
- Godfroy, A., Meunier, J.-R., Guezennec, J., Lesongeur, F., Raguénès, G., Rimbault, A., and Barbier, G. (1996).** *Thermococcus fumicolans* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeum isolated from deep-sea hydrothermal vent in North Fiji basin. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 1113-1119.
- Godfroy, A., Meunier, J.R., Guezennec, J., Lesongeur, F., Raguènes, G., Rimbault, A., and Barbier, G. (1999).** *Thermococcus fumicolans* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the North Fiji Basin (vol 46, pg 1113, 1996). *Int J Syst Bacteriol* **49 Part 4**: 1951.
- Godfroy, A., Lesongeur, F., Raguénès, G., Quérellou, J., Antoine, E., Meunier, J.-R. et al. (1997).** *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 622-626.
- Godon, J.J., Duthoit, F., Delbes, C., Millet, L., and Montel, M.-C. (2001).** Utilisation d'une technique d'empreinte

- moléculaire dans l'étude d'écosystème microbiens complexes. Application à la fabrication d'un fromage au lait cru "AOC Salers". *INRA EDP Sciences*: 257-262.
- Gold, T. (1992).** The Deep, Hot Biosphere. *PNAS* **89**: 6045-6049.
- Gonzalez-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R., and Amils, R. (2003).** Microbial Ecology of an Extreme Acidic Environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4853-4865.
- Gonzalez, J.M., Kato, C., and Horikoshi, K. (1995).** *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Archive of Microbiology* **164**: 159-164.
- Gonzalez, J.M., Shekells, D., Viebahn, M., Krupatkina, D., Borges, K.M., and Robb, F.T. (1999).** *Thermococcus waiotapuensis* sp nov., an extremely thermophilic archaeon isolated from a freshwater hot spring. *Arch. Microbiol.* **172**: 95-101.
- Gonzalez, J.M., Masuchi, Y., Robb, F.T., Ammeramn, J.W., Maeder, D.L., Yanagibayashi, M. et al. (1998).** *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**: 123-130.
- Gotz, D., Banta, A., Beveridge, T.J., Rushdi, A.I., Simoneit, B., and Reysenbach, A.L. (2002).** *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1349-1359.
- Greene, A.C., Patel, B.K., and Sheehy, A.J. (1997).** *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 505-509.
- Grote, R., Li, L.N., Tamaoka, J., Kato, C., Horikoshi, K., and Antranikian, G. (1999).** *Thermococcus siculi* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Mid-Okinawa Trough. *Extremophiles* **3**: 55-62.
- Grundmann, G.L., and Normand, P. (2000).** Microscale Diversity of the Genus *Nitrobacter* in Soil on the Basis of Analysis of Genes Encoding rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4543-4546.
- 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. *Archive of Microbiology* **166**: 308-314.
- Hamersley, M.R., Lavik, G., Woebken, D., Rattray, J.E., Lam, P., and Hopmans, E.C. (2007).** Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr* **52**: 923-933.
- Haring, M., Vestergaard, G., Rachel, R., Chen, L., Garrett, R.A., and Prangishvili, D. (2005).** Virology: Independent virus development outside a host. *Nature* **436**: 1101-1102.
- Harmsen, H.J.M., Prieur, D., and Jeanthon, C. (1997).** Distribution of Microorganisms in Deep-Sea Hydrothermal Vent Chimneys Investigated by Whole-Cell Hybridization and Enrichment Culture of Thermophilic Subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2876-2883.
- Henstra, A.M., Dijkema, C., and Stams, A.J.M. (2007).** *Archaeoglobus fulgidus* couples CO oxidation to sulfate reduction and acetogenesis with transient formate accumulation. *Environ Microbiol* **9**: 1836-1841.
- Hoek, J., Banta, A., Hubler, F., and Reysenbach, A.-L. (2003).** Microbial diversity of a sulphide spire located in the Edmond deep-sea hydrothermal vent field on the Central Indian Ridge. *Geobiology* **1**: 119-127.
- Hohn, M.J., Hedlund, B.P., and Huber, H. (2002).** Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum

- "Nanoarchaeota". Indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *Syst Appl Microbiol* **25**: 551-554.
- Holden, J.F., Takai, K., Summit, M., Bolton, S., Zyskowski, J., and Baross, J.A. (2001).** Diversity among three novel groups of hyperthermophilic deep-sea *Thermococcus* species from three sites in the northeastern Pacific Ocean. *FEMS Microbiol Ecol* **36**: 51-60.
- Houghton, J.L., Seyfried Jr, W.E., Banta, A., and Reysenbach, A.-L. (2007).** Continuous enrichment culturing of thermophiles under sulfate and nitrate-reducing conditions and at deep-sea hydrostatic pressures. *Extremophiles* **11**: 371-382.
- Huber, H., Jannasch, H., Rachel, R., Fuchs, T., and Stetter, K.O. (1997).** *Archaeoglobus veneficus* sp.nov., a Novel Facultative Chemolithoautotrophic Hyperthermophilic Sulfite Reducer, Isolated from Abyssal Black Smoker. *Syst Appl Microbiol* **20**: 374-380.
- Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyschkony, I., Rachel, R., and Stetter, K.O. (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. *Int J Syst and Evol Microbiol* **50**: 2093-2100.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., and Stetter, K.O. (2002a).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1585-1594.
- Huber, J.A., Butterfield, D.A., and Baross, J.A. (2003).** Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 393-409.
- Huber, R., Thomm, M., König, H., Thies, G., and Stetter, K.O. (1982).** *Methanococcus thermolithotrophicus* a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Archive of Microbiology* **132**: 47-50.
- Huber, R., Stoffers, P., Cheminee, J.L., Richnow, H.H., and Stetter, K.O. (1990a).** Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open sea plume of erupting Macdonald seamount. *Nature* **345**: 179-182.
- Huber, R., Woese, C.R., Langworthy, T.A., Kristjansson, J.K., and Stetter, K.O. (1990b).** *Fervidobacterium islandicum* sp. nov., a new thermophilic eubacterium belonging to the "Thermotogales". *Arch. Microbiol.* **154**: 105-111.
- Huber, R., Burggraf, S., Mayer, T., Barns, S.M., Rossnagel, P., and Stetter, K.O. (1995a).** Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by *in situ* RNA analysis. *Nature* **376**: 57-58.
- Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, V.B., and Stetter, K.O. (1986).** *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Archive of Microbiology* **144**: 324-333.
- Huber, R., Stöhr, J., Honenhaus, S., Rachel, R., Burggraf, S., Jannasch, H.W., and Stetter, K.O. (1995b).** *Thermococcus chitonophagus* sp. nov., a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal environment. *Archive of Microbiology* **164**: 255-264.
- Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., A., T., Burggraff, S., König, H. et al. (1992).** *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov. represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* **15**: 340-351.
- Hulth, S., Aller, R.C., and Gilbert, F. (1999).** Coupled anoxic nitrification/manganese reduction in marine sediments. *Geoch Cosmoch Acta* **63**: 49-66.

- Humphris, S.E., Herzig, P.M., Miller, D.J., Alt, J.C., Becker, K., Brown, D. et al. (1995). The internal structure of an active sea-floor massive sulphide deposit. *Nature* **377**: 713-716.
- Hunik, J.H., Van Den Hoogen, M.P., De Boer, W., Smit, M., and Tramper, J. (1993). Quantitative Determination of the Spatial Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* Cells Immobilized in {kappa}-Carrageenan Gel Beads by a Specific Fluorescent-Antibody Labelling Technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1951-1954.
- Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004). *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the {varepsilon}-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1477-1482.
- Inagaki, F., Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2003). *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing ϵ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1801-1805.
- Jannasch, H.W. (1985). The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **225**: 277-297.
- Jannasch, H.W. (1995). Life at the sea floor. *Nature* **374**: 676-677.
- Jannasch, H.W., and Taylor, C.D. (1985). Deep-sea microbiology. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 487-514.
- Jannasch, H.W., and Mottl, M.J. (1985). Geomicrobiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Science* **229**: 717-725.
- Jannasch, H.W., Wirsen, C.O., Nelson, D., and Robertson, L. (1985). *Thiomicrospira crunogena* sp. nov. a colorless sulfur-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **35**: 422-424.
- Jannasch, H.W., Wirsen, C.O., Molyneaux, S.J., and Langworthy, T.A. (1988). Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1203-1209.
- Jannasch, H.W., Wirsen, C.O., Molyneaux, S.J., and Langworthy, T.A. (1992). Comparative physiological studies on hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3472-3481.
- Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cuff, V., Banta, A., Reysenbach, A.L., and Prieur, D. (2002). *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 765-772.
- Jeanthon, C., S, L.H., Reysenbach, A.L., Vernet, M., Messner, P., Sleytr, U.B., and Prieur, D. (1998). *Methanococcus infernus* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International-Journal-of-Systematic-Bacteriology* **48**: 913-919.
- Jeanthon, C., S, L.H., Reysenbach, A.L., 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 4213 as *Methanococcus fervens* sp. nov. *International-Journal-of-Systematic-Bacteriology* **49**: 583-589.
- Jetten, M., S. M. (2008). The microbial nitrogen cycle. *Environ Microbiol* **10**: 2903-2909.
- Jetten, M.S., Schmid, M., Van de Pas-Schoonen, K.T., damste, J.S.S., and Strous, M. (2005). Anammox Organisms: enrichment, cultivation and environmental

- analysis. *Methods in Enzymology* **397**: 34-57.
- Jolivet, E., L'Haridon, S., Corre, E., Forterre, P., and Prieur, D. (2003).** *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 847-851.
- Jolivet, E., Corre, E., L'Haridon, S., Forterre, P., and Prieur, D. (2004).** *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles* **8**: 219-227.
- Jones, W.J., Leigh, J.A., Mayer, F., Woese, C.R., and Wolfe, R.S. (1983).** *Methanococcus jannaschii* sp. nov. an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archive of Microbiology* **136**: 254-261.
- Karavaiko, G.I., Dubinina, G.A., and Kondrat'eva, T.F. (2006).** Lithotrophic Microorganisms of the Oxidative Cycles of Sulfur and Iron. *Microbiol* **75**: 512-545.
- Karl, D.M. (1995) Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities. In *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*. Karl, D.M. (ed): CRC Press, pp. 35-124.
- Kartal, B., Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Schalk, J., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., and Strous, M. (2007a).** Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ Microbiol* **9**: 635-642.
- Kartal, B., van Niftrik, L., Rattray, J., van de Vossenberg, J.L.C.M., Schmid, M.C., Sinninghe Damste, J. et al. (2008).** *Candidatus "Brocadia fulgida"*: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol Ecol* **63**: 46-55.
- Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L.A., van de Vossenberg, J., Schmid, M.C., Webb, R.I. et al. (2007b).** *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* **30**: 39-49.
- Kashefi, K., and Lovley, D.R. (2003).** Extending the Upper Temperature Limit for Life. *Science* **301**: 934-.
- Kashefi, K., Holmes, D.E., Baross, J.A., and Lovley, D.R. (2003).** Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the Geobacteraceae from the "Bag City" Hydrothermal Vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2985-2993.
- Kashefi, K., Shelobolina, E.S., Elliott, W.C., and Lovley, D.R. (2008).** Growth of Thermophilic and Hyperthermophilic Fe(III)-Reducing Microorganisms on a Ferruginous Smectite as the Sole Electron Acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 251-258.
- Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., Gaw Van Praagh, C.V., Reysenbach, A.L., and Lovley, D.R. (2002).** *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 719-728.
- Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T., and Minoda, Y. (1984).** *Hydrogenobacter thermophilus*, gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, aerobic, hydrogen-oxidizing bacterium. *Int. J. System. Bacteriol.* **34**: 5-10.
- Kaye, J.Z., Marquez, M.C., Ventosa, A., and Baross, J.A. (2004).** *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 499-511.
- Keller, M., Braun, F.-J., Dirmeier, R., Hafenbradl, D., Burggraf, S., Rachel, R., and Stetter, K.O. (1995).** *Thermococcus alcaliphilus* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeum growing on polysulfide at alkaline pH. *Archive of Microbiology* **164**: 390-395.

- Kelley, D.S., Karson, J.A., Fruh-Green, G.L., Yoerger, D.R., Shank, T.M., Butterfield, D.A. et al. (2005). A Serpentinite-Hosted Ecosystem: The Lost City Hydrothermal Field. *Science* **307**: 1428-1434.
- Kublanov, I.V., Prokofeva, M.I., Kostrikina, N.A., Kolganova, T.V., Tourova, T.P., Wiegel, J., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2007). *Thermoanaerobacterium aciditolerans* sp. nov., a moderate thermoacidophile from a Kamchatka hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 260-264.
- Kuenen, J.G. (2008). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Micro* **6**: 320-326.
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H.W., Fricke, H., Trincone, A. et al. (1991). *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch. Microbiol.* **156**: 239-247.
- Kuwabara, T., Minaba, M., Ogi, N., and Kamekura, M. (2007). *Thermococcus celericrescens* sp. nov., a fast-growing and cell-fusing hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 437-443.
- Kuwabara, T., Minaba, M., Iwayama, Y., Inouye, I., Nakashima, M., Marumo, K. et al. (2005). *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2507-2514.
- Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B.M., and Amann, R. (2005). Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6478-6483.
- Kuypers, M.M.M., Sliemers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.B., Kuenen, J.G. et al. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* **422**: 608-611.
- Kwak, Y.S., Kobayashi, T., Akiba, T., Horikoshi, K., and Kim, Y.B. (1995). A hyperthermophilic sulfur-reducing Archaeobacterium, *Thermococcus* sp. DT1331, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 1666-1669.
- L'Haridon, S., Miroshnichenko, M.L., Hippe, H., Fardeau, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Stackebrandt, E., and Jeanthon, C. (2002). *Petrotoga olearia* sp. nov. and *Petrotoga sibirica* sp. nov., two thermophilic bacteria isolated from a continental petroleum reservoir in Western Siberia. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1715-1722.
- L'Haridon, S., Reysenbach, A.-L., Banta, A., Messner, P., Schumann, P., Stackebrandt, E., and Jeanthon, C. (2003). *Methanocaldococcus indicus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1931-1935.
- L'Haridon, S., Cilia, V., Messner, P., Raguene, G., Gambacorta, A., Sleytr, U.B. et al. (1998). *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 701-711.
- L'Haridon, S., Miroshnichenko, M.L., Kostrikina, N.A., Tindall, B.J., Spring, S., Schumann, P. et al. (2006a). *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1047-1053.
- L'Haridon, S., Reysenbach, A.-L., Tindall, B.J., Schönheit, P., Banta, A., Johnsen, U. et al. (2006b). *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. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2843-2852.
- Lauerer, G., Kristjansson, J.K., Langworthy, T.A., König, H., and

- Stetter, K.O. (1986).** *Methanothermus sociabilis* sp. nov., a second species within the Methanothermacea growing at 97°C. *System. Appl. Microbiol.* **8**: 100-105.
- Le Roy, M. (2008).** Recherche de micro-organismes ferreducteurs en milieu hydrothermal profond. *Master report*.
- Leclerc, M., Delbes, C., Moletta, R., and Godon, J.J. (2001).** Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiology Ecology* **34**: 213-220.
- Lepage, E., Marguet, E., Geslin, C., Matte-Tailliez, O., Zillig, W., Forterre, P., and Tailliez, P. (2004).** Molecular Diversity of New Thermococcales Isolates from a Single Area of Hydrothermal Deep-Sea Vents as Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting and 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1277-1286.
- Lesongeur, F., Godfroy, A., Briand, P., Crassous, P., Byrne, N., and Khripounoff, A. (soumis).** Deep sea vent indigenous thermophilic microorganism and larvae are exported with hydrothermal vent particles.
- Lien, T., Madsen, M., Rainey, F.A., and Birkeland, N.K. (1998).** *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. *Int. J. System. Bacteriol.* **48**: 1007-1013.
- Lindsay, M.R., Webb, R.I., Strous, M., Jetten, M.S., Butler, M.K., Forde, R.J., and Fuerst, J.A. (2001).** Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archive of Microbiology* **175**: 413-429.
- Liu, S.-Y., Rainey, F.A., H.W., M., mayer, F., and Wiegel, J. (1996).** *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a slightly acidophilic anerobic thermophile isolated from variuous hot springs in New Zealand, and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. *Int. J. System. Bacteriol.* **46**: 388-396.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J.-P., and Godon, J.-J. (2006).** Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ Microbiol* **8**: 720-731.
- 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 Microbiol Ecol* **35**: 287-293.
- Lonsdale, P., and Lawver, L.A. (1980).** Immature plate boundary zones studied with a submersible in the Gulf of California. *Geological Society of America Bulletin* **91**: 555-569.
- 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.
- Lovley, D.R., and Phillips, E.J.P. (1986).** Organic Matter Mineralization with Reduction of Ferric Iron in Anaerobic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 683-689.
- Lovley, R., Holmes, E., and Nevin, P. (2004)** Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. In *Adv. Microb. Physiol.:* Academic Press, pp. 219-286.
- Madigan, M., and Martinko, J. (2007) *Brock Biologie des micro-organismes:* Pearson Education, France.
- Marteinsson, V.T. (1999).** Isolation and characterization of *Thermus thermophilus* Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **3**: 247-251.
- Marteinsson, V.T., Birrien, J.L., and Prieur, D. (1997).** *In situ* enrichment and isolation of thermophilic microorganisms from deep-sea vent environments. *Can. J. Microbiol.* **43**: 694-697.
- Marteinsson, V.T., Birrien, J.-L., Kristjansson, J.K., and Prieur, D. (1995).** First isolation of thermophilic aerobic non-sporulating heterotrophic

- bacteria from deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiol Ecol* **18**: 163-174.
- Marteinsson, V.T., Birrien, J.L., Jeanthon, C., and Prieur, D. (1996).** Numerical taxonomic study of thermophilic *Bacillus* isolated from three geographical separated deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiol Ecol* **21**: 255-266.
- Marteinsson, V.T., Birrien, J.L., Reysenbach, A.L., Vernet, M., Marie, D., Gambacorta, A. et al. (1999).** *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 351-359.
- McCliment, E.A., Voglesonger, K.M., O'Day, P.A., Dunn, E.E., Holloway, J.R., and Cary, S.C. (2006).** Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. *Environ Microbiol* **8**: 114-125.
- McHatton, S.C., Barry, J.P., Jannasch, H.W., and Nelson, D.C. (1996).** High Nitrate Concentrations in Vacuolate, Autotrophic Marine Beggiatoa spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 954-958.
- Mehta, M., and Baross, J. (2006).** Nitrogen fixation at 92°C by a hydrothermal vent archaeon. *Science* **314**: 1783-1785.
- Mehta, M.P., Butterfield, D.A., and Baross, J.A. (2003).** Phylogenetic Diversity of Nitrogenase (nifH) Genes in Deep-Sea and Hydrothermal Vent Environments of the Juan de Fuca Ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 960-970.
- Mével, G., and Prieur, D. (1998).** Thermophilic heterotrophic nitrifiers isolated from Mid-Atlantic Ridge deep-sea hydrothermal vents. *Can J of Microbiol* **44**: 723-733.
- Mével, G., and Prieur, D. (2000).** Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Can J of Microbiol* **46**: 465-473.
- Meyer, R.L., Risgaard-Petersen, N., and Allen, D.E. (2005).** Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6142-6149.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.-L., Joulain, C., Magot, M., Thomas, P., Tholozan, J.-L., and Ollivier, B. (2007).** *Petrotoga halophila* sp. nov., a thermophilic, moderately halophilic, fermentative bacterium isolated from an offshore oil well in Congo. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 40-44.
- Miranda-Tello, E., Fardeau, M.-L., Thomas, P., Ramirez, F., Casalot, L., Cayol, J.-L. et al. (2004).** *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 169-174.
- Miroshnichenko, M.L., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2006).** Recent developments in the thermophilic microbiology of deep sea hydrothermals vents. *Extremophiles* **10**: 85-96.
- Miroshnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Neuner, A., Kostrikina, N.A., Chernych, N.A., and Alekseev, V.A. (1989).** *Thermococcus stetteri* sp. nov., a new extremely thermophilic marine sulfur-metabolizing archaeobacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**: 257-262.
- Miroshnichenko, M.L., Gongadze, G.M., Rainey, F.A., Kostyukova, A.S., Lysenko, A.M., Chernyh, N.A., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (1998).** *Thermococcus gorgonarius* sp. nov. and *Thermococcus pacificus* sp. nov.: heterotrophic extremely thermophilic archaea from New Zealand submarine hot vents. *Int. J. System. Bacteriol.* **48**: 23-29.
- Miroshnichenko, M.L., Kostrikina, N.A., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Hippe, H., Stackebrandt, E., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2002).** *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing epsilon-

proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1299-1304.

Miroshnichenko, M.L., L'Haridon, S., Schumann, P., Spring, S., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Jeanthon, C., and Stackebrandt, E. (2004). *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of Nautiliales ord. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 41-45.

Miroshnichenko, M.L., Kostrikina, N.A., Chernyh, N.A., Pimenov, N.V., Tourova, T.P., Antipov, A.N. et al. (2003a). *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 323-329.

Miroshnichenko, M.L., Slobodkin, A.I., Kostrikina, N.A., L'Haridon, S., Nercessian, O., Spring, S. et al. (2003b). *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1637-1641.

Miroshnichenko, M.L., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Antipov, A.N., Kostrikina, N.A., Tindall, B.J. et al. (2003c). *Oceanithermus profundus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, facultatively chemolithoheterotrophic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 747-752.

Miroshnichenko, M.L., L'Haridon, S., Nercessian, O., Antipov, A.N., Kostrikina, N.A., Tindall, B.J. et al. (2003d). *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Thermaceae from a deep-sea hot vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1143-1148.

Moran, J.J., Beal, E.J., Vrentas, J.M., Orphan, V.J., Freeman, K.H., and House, C.H. (2008). Methyl sulfides as intermediates in the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol* **10**: 162-173.

Mori, K., Maruyama, A., Urabe, T., Suzuki, K.-i., and Hanada, S. (2008). *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 810-816.

Mori, K., Kakegawa, T., Higashi, Y., Nakamura, K.-i., Maruyama, A., and Hanada, S. (2004). *Oceanithermus desulfurans* sp. nov., a novel thermophilic, sulfur-reducing bacterium isolated from a sulfide chimney in Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1561-1566.

Moussard, H., L'Haridon, S., Tindall, B.J., Banta, A., Schumann, P., Stackebrandt, E. et al. (2004). *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 227-233.

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. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1555-1562.

Mozgova, N.N., Trubkin, N.V., Borodaev, Y.S., Cherkashev, G.A., Stepanova, T.V., Semkova, T.A., and Uspenskaya, T.Y. (2008). Mineralogy of massive sulfides from the Ashadze hydrothermal field, 13°N, Mid-Atlantic Ridge. *Can Mineral* **46**: 545-567.

Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol* **16**: 177-183.

Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., and Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol* **148**: 257-266.

- 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 863-869.
- Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K., and Sako, Y. (2004a).** *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 329-335.
- Nakagawa, S., Inagaki, F., Takai, K., Horikoshi, K., and Sako, Y. (2005).** *Thioreductor micantisoli* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, sulfur-reducing chemolithoautotroph within the {varepsilon}-Proteobacteria isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 599-605.
- Nakagawa, T., and Fukui, M. (2003).** Molecular Characterization of Community Structures and Sulfur Metabolism within Microbial Streamers in Japanese Hot Springs. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7044-7057.
- Nakagawa, T., Nakagawa, S., Inagaki, F., Takai, K., and Horikoshi, K. (2004b).** Phylogenetic diversity of sulfate-reducing prokaryotes in active deep-sea hydrothermal vent chimney structures. *FEMS Microbiol Lett* **232**: 145-152.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., and Schleifer, K.H. (1998).** Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiol* **144** (Pt 12): 3257-3266.
- Nercessian, O., Reysenbach, A.-L., Prieur, D., and 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.
- Nercessian, O., Fouquet, Y., Pierre, C., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2005a).** Diversity of *Bacteria* and *Archaea* associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **7**: 698-714.
- Nercessian, O., Bienvenu, N., Moreira, D., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2005b).** Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environ Microbiol* **7**: 118-132.
- 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. *Environ Microbiol* **6**: 170-182.
- Neuner, A., Jannasch, H.W., Belkin, S., and Stetter, K.O. (1990).** *Thermococcus litoralis* sp. nov. : A new species of extremely thermophilic marine archaeobacterium. *Arch. Microbiol.* **153**: 205-207.
- Ng, T.K., and Kenealy, W.R. (1986)** Industrial applications of thermostable enzymes. In *Thermophiles - general, Molecular and Applied Microbiology*. Brock, T.D. (ed). New-York (USA): Jon Wiley & sons.
- Nunoura, T., Oida, H., Miyazaki, M., and Suzuki, Y. (2008a).** *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 659-665.
- Nunoura, T., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Takai, K., and Horikoshi, K. (2008b).** *Hydrogenivirga okinawensis* sp. nov., a thermophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 676-681.
- Nunoura, T., Oida, H., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Takai, K., and Horikoshi, K. (2007a).** *Desulfothermus okinawensis* sp. nov., a thermophilic and heterotrophic

- sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal field. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2360-2364.
- Nunoura, T., Oida, H., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Takai, K., and Horikoshi, K. (2007b).** *Marinitoga okinawensis* sp. nov., a novel thermophilic and anaerobic heterotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa Trough
Int J Syst Evol Microbiol **57**: 467-471.
- Page, A., Tivey, M.K., Stakes, D.S., and Reysenbach, A.-L. (2008).** Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environ Microbiol* **10**: 874-884.
- Page, A., Juniper, S.K., Olagnon, M., Alain, K., Desrosiers, G., Querellou, J., and Cambon-Bonavita, M.A. (2004).** Microbial diversity associated with a *Paralvinella sulfincola* tube and the adjacent substratum on an active deep-sea vent chimney. *Geobiol* **2**: 225-238.
- Paper, W., Jahn, U., Hohn, M.J., Kronner, M., Nather, D.J., Burghardt, T. et al. (2007).** *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of 'Nanoarchaeum equitans'. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 803-808.
- Penton, C.R., Devol, A.H., and Tiedje, J.M. (2006).** Molecular Evidence for the Broad Distribution of Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria in Freshwater and Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6829-6832.
- Perevalova, A.A., Svetlichny, V.A., Kublanov, I.V., Chernyh, N.A., Kostrikina, N.A., Tourova, T.P. et al. (2005).** *Desulfurococcus fermentans* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon from a Kamchatka hot spring, and emended description of the genus *Desulfurococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 995-999.
- Perner, M., Kuever, J., Seifert, R., Pape, T., Koschinsky, A., Schmidt, K. et al. (2007).** The influence of ultramafic rocks on microbial communities at the Logatchev hydrothermal field, located 15°N on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol Ecol* **61**: 97-109.
- 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 25-33.
- Pikuta, E.V., Marsic, D., Itoh, T., Bej, A.K., Tang, J., Whitman, W.B. et al. (2007).** *Thermococcus thioeducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1612-1618.
- Pimenov, N.V., Yu. Lein, A., Sagalevich, A.M., and Ivanov, M.V. (2000).** Carbon dioxide assimilation and methane oxidation in various zones of the Rainbow hydrothermal field. *Microbiol* **69**: 689-697.
- Pledger, R.J., and Baross, J.A. (1989).** Characterization of an extremely thermophilic archaebacterium isolated from a black smoker polychaete (*Paralvinella* sp.) at the Juan de Fuca Ridge. *Syst Appl Microbiol* **12**: 249-256.
- Pledger, R.J., and Baross, J.A. (1991).** Preliminary description and nutritional characterization of a chemoorganotrophic archaebacterium growing at temperature up to 110°C isolated from a submarine hydrothermal vent environment. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 203-211.
- Pley, U., Schipka, J., Gambacorta, A., H.W., J., Fricke, H., Rachel, R., and Stetter, K.O. (1991).** *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C. *System. Appl. Microbiol.* **14**: 245-253.
- Polz, M.F., and Cavanaugh, C.M. (1995).** Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *PNAS* **92**: 7232-7236.
- Postec, A. (2005)** Diversité des populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique : cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles. In:

Univeristé de Provence (Aix-Marseille I), p. 251.

Postec, A., Pignet, P., Cueff-Gauchard, V., Schmitt, A., Querellou, J., and Godfroy, A. (2005a). Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media. *Res Microbiol* **156**: 82-87.

Postec, A., Urios, L., Lesongeur, F., Ollivier, B., Quérellou, J., and Godfroy, A. (2005b). Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems. *Cur Microbiol* **50**: 138-144.

Postec, A., Lesongeur, F., Pignet, P., Ollivier, B., Quérellou, 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., Le Breton, C., Fardeau, M.L., Lesongeur, F., Pignet, P., Quérellou, 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1217-1221.

Purdy, G.M., Sempere, J.-C., Schouten, H., Dubois, D.L., and Goldsmith, R. (1990). Bathymetry of the Mid-Atlantic Ridge, 24-31°N: A Map Series. *Mar Geophys Res* **12**: 247-252.

Rabus, R., Hansen, T.A., and Widdel, F. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. *The Prokaryotes*: 659-768.

Raguènes, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H. et al. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 67-73.

Raguènes, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P., and Barbier, G. (1997).

Vibrio diabolicus, sp. nov. a new polysaccharide-secreting organisms isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychate annelid, *Alvinella pompejana*. *Int. J. System. Bacteriol.* **47**: 989-995.

Raguènes, G., Cambon-Bonavita, M.-A., Lohier, J.-F., Boisset, C., and Guézennec, J. (2003). A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an *Alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Cur Microbiol* **46**: 448-452.

Raguènes, G., Meunier, J.R., Antoine, E., Godfroy, A., Caprais, J.C., Lesongeur, F. et al. (1995). Biodiversité d'Archaea hyperthermophiles de sites hydrothermaux du Pacifique oriental. *C.R. Acad. Sci. Paris* **318**: 395-402.

Raguenes, G.H.C., Peres, A., Ruimy, R., Pignet, P., Christen, R., Loaec, M. et al. (1997). *Alteromonas infernus* sp nov, a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 422-430.

Randrianalivelo, H., F, L., and Godfroy, A. (2006). Etude moléculaire de la diversité des micro-organismes dans les tapis bactériens de la source hydrothermale de Lucky Strike. . *Master report*.

Raven, N., Ladwa, N., and Sharp, R. (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**: 263-267.

Raven, N.D.H., and Sharp, R.J. (1997). Development of defined and minimal media for the growth of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* Vc1. *FEMS Microbiol Lett* **146**: 135-141.

Reysenbach, A.-L., Liu, Y., Banta, A.B., Beveridge, T.J., Kirshtein, J.D., Schouten, S. et al. (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **442**: 444-447.

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. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3798-3806.
- Richards, F.A. (1965).** Anoxin basins and fjords. *Chemical Oceanography*. Academic Press, London: 611-645.
- Rona, P.A. (1984).** in *Mezhdunarodnyy geologicheskiiy kongress; 27 Moscow, Aug. 4-14*: 67-68.
- Rona, P.A., Klinkhammer, G., Nelsen, T.A., Trefry, J.H., and Elderfield, H. (1986).** Black smokers, massive sulphides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge. *Nature* **321**: 33-37.
- 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-.
- Ruby, E.G., and Jannasch, H.W. (1982).** Physiological characteristics of *Thiomicrospira* sp. strain L12 isolated from deep-sea hydrothermal vents. *J. Bacteriol.* **149**: 161-165.
- Ruby, E.G., Wirsen, C.O., and Jannasch, H.W. (1981).** Chemolithotrophic Sulfur-Oxidizing Bacteria from the Galapagos Rift Hydrothermal Vents *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 317-324.
- Rysgaard, S., and Nøhr Glud, R. (2004).** Anaerobic N₂ production in Arctic sea ice. *Limnol oceanogr* **49**: 86-94.
- Rysgaard, S., Nøhr Glud, R., Risgaard-Petersen, N., and Dalsgaard, T. (2004).** Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnol oceanogr* **49**: 1493-1502.
- Sako, Y., Nakagawa, S., Takai, K., and Horikoshi, K. (2003).** *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 59-65.
- Sako, Y., Nomura, N., Ushida, A., Ishida, Y., Morii, H., Hoaki, T., and Maruyama, T. (1996).** *Aeropyrum pernix*, gen. nov; sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100°C. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 1070-1077.
- 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.
- Sarrazin, J., Sarradin, P.-M., and participants, a.t.M.c. (2006).** MoMARETO: a cruise dedicated to the spatio-temporal dynamics and the adaptations of hydrothermal vent fauna on the Mid-Atlantic Ridge. *InterRidge News* **15**: 24-33.
- Schäfer, S., Barkowski, C., and Fuchs, G. (1986).** Carbon assimilation by the autotrophic thermophilic archaebacterium *Thermoproteus neutrophilus*. *Archive of Microbiology* **146**: 301-308.
- Schmid, M.C., Risgaard-Petersen, N., van de Vossenberg, J., Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Petersen, J. et al. (2007).** Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ Microbiol* **9**: 1476-1484.
- Schmidt, C., Gaill, F., and Le Bris, N. (soumis).** Biotic and abiotic controls on iron-oxyhydroxide deposition in the gill chamber of the symbiotic vent shrimp *Rimicaris exoculata*.
- Schmidt, C., Vuillemin, R., Le Gall, C., Gaill, F., and Le Bris, N. (2008).** Geochemical energy sources for microbial primary production in the environment of hydrothermal vent shrimps. *Mar. Chem.* **108**: 18-31.
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G. et al. (2003).** New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 481-492.
- Schouten, S., Strous, M., Kuypers, M.M.M., Rijpstra, W.I.C., Baas, M., Schubert, C.J. et al. (2004).** Stable Carbon Isotopic Fractionations Associated with Inorganic Carbon Fixation by

- Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3785-3788.
- Schrenk, M.O., Kelley, D.S., Delaney, J.R., and Baross, J.A. (2003).** Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3580-3592.
- Schrenk, M.O., Kelley, D.S., Bolton, S.A., and Baross, J.A. (2004).** Low archaeal diversity linked to seafloor geochemical processes at the Lost City Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **6**: 1086-1095.
- Schubert, C.J., Durisch-Kaiser, E., Wehrli, B., Thamdrup, B., Lam, P., and Kuypers, M.M.M. (2006).** Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika) *Environ Microbiol* **8**: 1857-1863.
- Sempere, J.-C., Purdy, G.M., and Schouten, H. (1990).** Segmentation of the Mid-Atlantic Ridge between 24°N and 30°40' N. *Nature* **344**: 427-431.
- Shapleigh, J. (2006) The Denitrifying Prokaryotes. In *The Prokaryotes*, pp. 769-792.
- Sharp, R.J., and Raven, N.D.H. (1997) Isolation and growth of hyperthermophiles. In *Applied Microbial Physiology : A practical approach*. Rhodes, P.M., and Stanbury, P.F. (eds): IRL Press, Oxford University press, pp. 23-51.
- Sinninghe Damste, J.S., Rijpstra, W.I.C., Geenevasen, J.A.J., Strous, M., and Jetten, M.S.M. (2005).** Structural identification of ladderane and other membrane lipids of planctomycetes capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox). *FEBS J* **272**: 4270-4283.
- Sinninghe Damste, J.S., Strous, M., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., van Duin, A.C.T. et al. (2002).** Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* **419**: 708-712.
- Slobodkin, A., Campbell, B., Cary, S.C., Bonch-Osmolovskaya, E., and Jeanthon, C. (2001).** Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiol Ecol* **36**: 235-243.
- Slobodkin, A.I., Tourova, T.P., Kostrikina, N.A., Chernyh, N.A., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Jeanthon, C., and Jones, B.E. (2003).** *Tepidibacter thalassicus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, fermentative bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1131-1134.
- Slobodkina, G.B., Kolganova, T.V., Tourova, T.P., Kostrikina, N.A., Jeanthon, C., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Slobodkin, A.I. (2008).** *Clostridium tepidiprofundum* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 852-855.
- Smith, A.J., and Hoare, D.S. (1977).** Specialist phototrophs, lithotrophs, and methylotrophs: a unity among diversity of prokaryotes? *Bacteriol. Rev* **41**: 419-477.
- Smith, J.L., Campbell, B.J., Hanson, T.E., Zhang, C.L., and Craig, C.S. (2008).** *Nautilia profundicola* sp. nov., a thermophilic, sulfur-reducing epsilonproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1598-1602.
- Sokolova, T.G., Jeanthon, C., Kostrikina, N.A., Chernyh, N.A., Lebedinski, A.V., Stackebrandt, E., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2004).** The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **8**: 317-323.
- Sokolova, T.G., González, J.M., Kostrikina, A., Chernyh, N.A., Tourova, T.P., Kato, C. et al. (2001).** *Carboxydobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 141-149.
- Stanier, R.Y., Paleroni, N.J., and Doudoroff, M. (1966).** The aerobics

- pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**: 159-271.
- Stetter, K.O. (2006).** History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles* **10**: 357-362.
- Stetter, K.O., König, H., and Stackebrandt, E. (1983).** *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulfur-reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. *System. Appl. Microbiol.* **4**: 535-551.
- Stetter, K.O., Thomm, M., Winter, J., Wildgruber, G., Huber, R., Zillig, W. et al. (1981).** *Methanothermus fervidus* sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an icelandic hot spring. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C2*.
- Strous, M., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S. (1999a).** Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3248-3250.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T. et al. (1999b).** Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**: 446-449.
- Strous, M., Pelletier, E., Manganot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W. et al. (2006).** Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**: 790-794.
- Stumm, W., and Morgan, J.J. (1996).** Aquatic chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. *John Wiley and Sons. New-York*.
- Summit, M., and Baross, J.A. (2001).** Special Feature: A novel microbial habitat in the mid-ocean ridge seafloor. *PNAS* **98**: 2158-2163.
- Takai, K., and Horikoshi, K. (1999a).** Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments. *Genetics* **152**: 1285-1297.
- Takai, K., and Horikoshi, K. (1999b).** Molecular phylogenetic analysis of archaeal intron-containing genes coding for rRNA obtained from a deep-subsurface geothermal water pool. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5586-5589.
- Takai, K., and Horikoshi, K. (2000a).** *Thermosipho japonicus* sp nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* **4**: 9-17.
- Takai, K., and Horikoshi, K. (2000b).** Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5066-5072.
- 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1089-1095.
- Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004a).** *Hydrogenimonas thermophila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the {varepsilon}-Proteobacteria, isolated from a black smoker in a Central Indian Ridge hydrothermal field. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 25-32.
- Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004b).** *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1095-1100.
- Takai, K., Sugai, A., Itoh, T., and Horikoshi, K. (2000).** *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 489-500.
- Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F., and Orihoshi, K. (2001).** Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3618-3629.
- Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2003a).** *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal

vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 839-846.

Takai, K., Nakagawa, S., Sako, Y., and Horikoshi, K. (2003b). *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. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1947-1954.

Takai, K., Hirayama, H., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004c). *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. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2325-2333.

Takai, K., Hirayama, H., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2005). *Lebetimonas acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, acidophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the Mariana Arc. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 183-189.

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

Takai, K., Nunoura, T., Ishibashi, J.-i., Lupton, J., Suzuki, R., Hamasaki, H. et al. (2008). Variability in the microbial communities and hydrothermal fluid chemistry at the newly discovered Mariner hydrothermal field, southern Lau Basin. *Journal of Geophysical Research* **113**: doi:10.1029/2007JG000521.

Teske, A., and Sorensen, K.B. (2007). Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME J* **2**: 3-18.

Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., de Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S.P. et al. (2002). Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1994-2007.

Thamdrup, B., and Dalsgaard, T. (2002). Production of N₂ through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1312-1318.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). Clustal-W-Improving the Sensitivity of progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

Tor, J.M., Amend, J.P., and Lovley, D.R. (2003). Metabolism of organic compounds in anaerobic, hydrothermal sulphate-reducing marine sediments. *Environ Microbiol* **5**: 583-591.

Trimmer, M., Nicholls, J., and Deflandre, B. (2003). Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6447-6454.

Tsushima, I., Kindaichi, T., and Okabe, S. (2007). Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Wat Res* **41**: 785-794.

Urios, L., Cueff, V., Pignet, P., and Barbier, G. (2004a). *Tepidibacter formicigenes* sp. nov., a novel spore-forming bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 439-443.

Urios, L., Cueff-Gauchard, V., Pignet, P., Postec, A., Fardeau, M.L., Ollivier, B., and Barbier, G. (2004b). *Thermosipho atlanticus* sp. nov., a novel member of *Thermotogales* isolated from a Mid-

- Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1953-1957.
- van de Graaf, A.A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M.S., Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1995).** Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1246-1251.
- Van Dover, C.L., Szuts, E.Z., Chamberlain, S.C., and Cann, J.R. (1989).** A novel eye in "eyeless" shrimp from hydrothermal vents in the Mid Atlantic Ridge. *Nature* **337**: 458-460.
- Van Dover, C.L., Humphris, S.E., Fornari, D., Cavanaugh, C.M., Collier, R., Goffredi, S.K. et al. (2001).** Biogeography and Ecological Setting of Indian Ocean Hydrothermal Vents. *Science* **294**: 818-823.
- Vargas, M., Kashefi, K., BluntHarris, E.L., and Lovley, D.R. (1998).** Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* **395**: 65-67.
- Vetriani, C., Speck, M.D., Ellor, S.V., Lutz, R.A., and Starovoytov, V. (2004).** *Thermovibrio ammonificans* sp. nov., a thermophilic, chemolithotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 175-181.
- Von Damm, K. (1995) Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids. In *Seafloor hydrothermal systems. Physical, chemical biological and geological interactions*. Humphris, S.E., Zierenberg, R.A., Mullineaux, L.S., and Thomson, R.E. (eds): American geophysical Union, pp. 222-246.
- Von Damm, K. (2001).** Lost City found. *Nature* **412**: 127-128.
- Voordeckers, J.W., Starovoytov, V., and Vetriani, C. (2005).** *Caminibacter mediatlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 773-779.
- Ward, B.B. (2000) Nitrification and the marine nitrogen cycle. In: *Int Soc Microbial Ecol*, pp. 427-454.
- Ward, B.B. (2003).** Significance of anaerobic ammonium oxidation in the ocean. *Trends Microbiol* **11**: 408-410.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., and Coates, J.D. (2006).** Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Micro* **4**: 752-764.
- Webster, G., C. J. Newberry, J. C. Fry, and Weightman., A.J. (2003).** Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16s rDNA-based techniques: a cautionary tale. *J Microbiol Meth* **55**: 155-164.
- Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A., and Barbier, G. (2001a).** *Marinitoga camini*, gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 495-504.
- Wery, N., Moricet, J.-M., Cueff, V., J., J., Pignet, P., Lesongeur, F. et al. (2001b).** *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1789-1796.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998a).** Prokaryotes: The unseen majority. *PNAS* **95**.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998b).** Prokaryotes: The unseen majority. *PNAS* **95**: 6578-6583.
- Windberger, E., Huber, R., Trincone, A., Fricke, H., and Stetter, K.O. (1989).** *Thermotoga thermarum* sp. nov. and *Thermotoga neapolitana* occurring in African continental solfataric springs. *Archive of Microbiology* **151**: 506-512.
- Wirsén, C.O., Brinkhoff, T., Kuever, J., Muyzer, G., Molyneaux, S.J., and Jannasch, H.W. (1998).** Comparison of a new *Thiomicrospira* species strain from The Mid-Atlantic Ridge with known

hydrothermal vent isolates. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4057-4059.

Woese, C.R. (1994). There must be a prokaryote somewhere : Microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.* **58**: 1-9.

Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *PNAS* **74**: 5088-5090.

Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579.

Yurkov, V., and Beatty, J.T. (1998). Isolation of Aerobic Anoxygenic Photosynthetic Bacteria from Black Smoker Plume Waters of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 337-341.

Zeikus, J.G., and Wolfe, R.S. (1972). *Methanobacterium thermoautotrophicus*, sp. nov. an anaerobic autotrophic extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **109**: 707-713.

Zemb, O., Haegeman, B., Delgenes, J.P., Lebaron, P., and Godon, J.J. (2007). Safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections,

dendrograms and diversity estimators. *Mol. Ecol. Notes* **7**: 767-770.

Zillig, W., and Reysenbach, A.L. (2001). Thermococcales. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Boone D.R., Castenholz R.W. & Garrity G. (eds). Springer-Verlag, New York **1**: 341-348.

Zillig, W., Yeats, S., Holtz, I., BÖck, A., M., R., Gropp, F., and Simon, G. (1986). *Desulfurolobus ambivalens*, gen. nov., sp. nov., an autotrophic archaebacterium facultatively oxidizing or reducing sulfur. *System. Appl. Microbiol.* **8**: 197-203.

Zillig, W., Holz, I., Klenk, H., Trent, J., Wunderl, S., Janekovik, D. et al. (1987). *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaebacterium representing a novel order, Thermococcales. *System. Appl. Microbiol.* **9**: 62-70.

Zillig, W., Holz, I., Janekoviv, D., Klenk, H.P., Imself, E., Trent, J. et al. (1990). *Hyperthermus butylicus*, a hyperthermophilic sulfur-reducing archaebacterium that ferments peptides. *J. Bacteriol.* **172**: 3959-3965.

Abstract

Since the discovery of oceanic hydrothermal vents, microbial diversity of this extreme environment was studied using both cultivation and molecular approaches. In this study the microbial diversity of active chimney from both TAG and Lucky Strike sites (Mid Atlantic Ridge) was investigated using both molecular survey and continuous enrichment culture in a bioreactor. To reproduce as close as possible environmental conditions the cultures were performed in oligotrophic conditions, in the presence of hydrogen and carbondioxide in the gas sweeping mix or using in situ sampled fluid/sea water mix as culture medium. The effect of environmental changes such as temperature and the absence or presence of sulphur was also investigated. *Archaeal* and *Bacterial* diversity was studied in both culture and natural samples. Through 16SrRNA gene sequences analysis of the enrichment cultures, microorganisms affiliated to *Archaeoglobales*, *Thermococcales*, *Desulfurococcales*, *Deferribacterales* and *Thermales* were detected depending of culture conditions. The effects of environmental changes (i.e. modification of culture conditions: temperature, electron donors and acceptors availability, medium composition) were shown to affect the microbial community in culture, as happens in their environment. We have also investigated the role of anammox in hydrothermal settings. Evidence for the occurrence of anammox in this particular habitat was demonstrated by concurrent surveys including the amplification of 16SrRNA gene sequences, ladderanes lipids analysis and measurement of a ^{14}N - ^{15}N production in isotope pairing experiments at 60 and 85°C. Together these results indicated that new deeply branching anammox bacteria may be active in these hot habitats.

Résumé

Depuis la découverte des sources hydrothermales océaniques, la diversité microbienne de cet environnement a été étudiée en utilisant des approches culturelles et moléculaires. Dans cette étude la diversité microbienne d'édifices hydrothermaux prélevés des sites TAG et Lucky Strike (Dorsale Médio-atlatique) a été étudiée par la réalisation d'inventaire moléculaires et de culture d'enrichissement en continu en bioréacteur. Afin de se rapprocher au mieux des conditions environnementales, les cultures ont été réalisées en condition et en présence d'hydrogène et de dioxyde de carbone ou en utilisant un mélange fluide hydrothermal/eau de mer comme milieu de culture. L'effet de changements environnementaux tel que la température et la présence ou l'absence de soufre a également été testé. La diversité des *Archaea* et des *Bacteria* a été étudiée aussi bien dans les échantillons que dans les cultures. Les analyses des séquences du gène codant pour l'ARNr16S ont mis en évidence des micro-organismes affiliés aux *Archaeoglobales*, *Thermococcales*, *Desulfurococcales*, *Deferribacterales* et *Thermales* suivant les conditions de cultures. L'effet des changements environnementaux, la température, les donneurs et accepteurs d'électrons conditionnent la composition des communautés cultivées, comme cela peut se produire dans l'environnement. Dans une deuxième partie de cette étude, nous avons étudié le rôle du métabolisme anammox dans les écosystèmes hydrothermaux. La présence et l'activité de bactéries anammox ont été montrées dans ces environnements par l'amplification du gène codant pour l'ARNr16S de micro-organismes anammox, et des mesures d'activité de production de ^{14}N - ^{15}N à haute température. Ces résultats indiquent qu'un nouveau groupe de bactéries anammox pourrait être actif à haute température dans l'écosystème hydrothermal.