

UBO

université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Microbiologie

École Doctorale Sciences de la Mer

présentée par

Cassandra Sara Lazar

Préparée à l'Ifremer, Laboratoire de
Microbiologie des Environnements Extrêmes

Diversité et activité des communautés microbiennes dans des sédiments marins associés aux émissions de fluides froids



Thèse soutenue le 1^{er} mars 2010

devant le jury composé de :

Andreas TESKE

Professeur, University of North Carolina

Patricia BONIN

Directrice de recherche, CNRS Marseille

Sylvie NAZARET

Chargée de recherche, CNRS Lyon

Laurent TOFFIN

Chargé de recherche, Ifremer Brest

Daniel PRIEUR

Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Georges BARBIER

Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Le courage de la vérité, la foi en la puissance de l'Esprit sont la première condition de la philosophie.
L'Homme, puisqu'il est Esprit, peut et doit se considérer comme digne de ce qu'il y a de plus sublime.

Il ne peut jamais surestimer la grandeur et la puissance de son Esprit.
Et s'il a cette foi, rien ne sera assez revêche ou dur pour ne pas se révéler à lui.

HEGEL

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les deux directeurs successifs du laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, Joel Querrelou et Anne Godfroy, de m'y avoir accueillie. Merci à Anne pour tous ses encouragements des derniers mois, pour avoir été à l'écoute des thésards désespérés que sont les thésards en fin de thèse et pour son efficacité à toute épreuve, et d'avoir pris le temps de relire mon introduction. Merci à Daniel Prieur de m'avoir fait confiance pour mener ces travaux de recherches, et de m'avoir permis de voyager en mer, au Japon, au Portugal pour y vivre des expériences inoubliables.

Je voudrais remercier les rapporteurs Andreas Teske et Patricia Bonin d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse, ainsi que les autres membres du jury.

Un gros merci à l'équipe des Marges Continentales. Toute ma reconnaissance va à Laurent pour m'avoir choisie, encadrée, soutenue et fait confiance tout au long de ce travail pour ces recherches sur cette thématique qui était toute fraîche lors de mon arrivée, la fin a été dure mais on a bien fini par y arriver ! Un grand merci à Stéphane, pour tous les bons moments passés au laboratoire (surtout pour tes remarques du genre "ah c'est l'heure de la PCR du jour ?"), d'avoir pris si efficacement en charge le problème de mon financement et pour tout ton soutien pendant ces derniers mois ! Merci à Benji pour toutes les soirées, les blagues au labo (ok pas pour toutes les blagues hein) et surtout de m'avoir remonté le moral et de m'avoir écoutée lors de tous mes moments de désespoir, et surtout n'oublie pas "the eyes of the ranger are upon you !". Merci à Marie, pour ta bonne humeur et ton accent mélodieux (je sais que tu attends avec impatience de récupérer mon bureau). Merci à Virginie, qui m'a fait connaître le labo, et avec qui j'ai partagé mes premières manips de thésarde. Merci à Julie, ma première stagiaire, d'avoir persévéré dans ces manips qui ne marchaient pas, mais tu vois ça a fini par payer ! Merci à tous les stagiaires passés ou présents de l'équipe (Morgane, Amandine ...). Enfin, Adrien j'espère ne pas t'avoir découragé de ta thèse, il est vrai que je râlais beaucoup sur la fin, mais maintenant que ma thèse se termine, je la regrette déjà ...

Un énorme merci à tous les membres du laboratoire côté Ifremer. Un gargantuesque merci à Christine, un peu l'âme du labo, pour toutes les discussions dans ton bureau, pour ton rire

si communicatif, et pour ton efficacité sans failles. Merci à Patricia, qui a su m'accueillir dès le début avec une gentillesse qui ne t'a jamais quittée, je n'oublierai pas toutes les heures passées dans mon coin DGGE me sentant un peu seule mais heureusement que tu étais derrière la vitre à sourire ou à venir m'encourager !

Un gros merci à tous les autres thésards passés ou présents: Erwan qui m'a vraiment aidée avec toutes mes questions de phylogénie, de manips, merci d'avoir relu mon intro de thèse, Benoît (déjà docteur, ça fait quoi de passer du côté obscur ?), Adeline et Séb qui ont été mes compagnons d'infortune pendant un bon moment dans le bureau, Valentin qui a su mettre à la mode les attaques Ninja et les Vicking, qui m'a enfin délivrée du mystère des PCR qui ne marchent pas (c'est un complot des templiers) et qui a rendu le voyage au Japon mémorable (c'est surtout ton dos et toute ma peau qui se souviendront longtemps du soleil Okinawaïen) puisses-tu demeurer quintessence de l'Univers et te remettre de tes expériences de la guerre du Vietnam !, Aurore dont le sourire n'a d'égal que sa gentillesse, et tous les autres ...

Merci à tous mes amis qui ont été là pendant cette thèse, Bénédicte on aura tant de souvenirs de cette thèse et de ce labo que je ne commencerai même pas à en citer je risquerais de me laisser emporter (la campagne avec les cauchemars et le mal de mer, les soirées, les grands moments de solitude, de désespoir ou d'intense rigolade, les films cultes avec un pot de glace et leurs grandes répliques ... "chuis pas un pingouin !") ! Clothilde on se retrouvera peut-être aux USA dans pas longtemps ! Romain mon fidèle ami tu tiendras toujours une place importante dans mes souvenirs de thésarde, et Duy-vi mon ami de toujours.

Je tiens à remercier mon grand-père qui a contribué à ma réussite, j'aurais aimé qu'il puisse être là, et ma grand-mère pour son soutien et sa présence à ma soutenance.

Je remercie enfin tout particulièrement ma mère, qui m'a appris à penser, et sans le courage de laquelle je n'en serais jamais arrivée là, ce manuscrit je te le dédie.

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
I – Les sédiments marins dans les habitats réduits	3
I-1 – Les zones d'émissions de fluides froids ("cold seeps"): contexte géologique	4
I-1-1 – Les zones de glissement	6
I-1-2 – Les volcans de boue	6
I-1-3 – Les pockmarks	7
I-1-4 – Le méthane dans les sédiments des zones d'émissions de fluides froids	8
I-2 – Les zones d'émissions de fluides froids: géochimie des sédiments et écosystèmes chimiosynthétiques	10
I-2-1 – La géochimie des sédiments des marges continentales	10
I-2-2 – Les écosystèmes chimiosynthétiques des marges continentales: indicateurs d'émissions de fluides froids	13
I-3 – La biosphère profonde	17
II – Les communautés microbiennes dans les sédiments marins des zones d'émissions de fluides froids	21
II-1 – La méthanogenèse: étape finale de dégradation anaérobie de la matière organique	21
II-1-1 – Les voies nutritionnelles de méthanogenèse	22
II-1-2 – La classification phylogénétique des méthanogènes	24
II-1-3 – La voie métabolique de méthanogenèse	25
II-1-4 – Les gènes métaboliques chez les <i>Archaea</i> méthanogènes	26
II-1-5 – L'activité des méthanogènes	28
II-2 – Le cycle du soufre et la réduction du sulfate (RS)	30
II-2-1 – La classification des bactéries sulfato-réductrices	32
II-2-2 – La réduction des sulfates	33
II-2-3 – Les habitats et l'activité des BSR	34
II-2-4 – Les gènes métaboliques et les microorganismes sulfato-réducteurs	36
II-3 – L'oxydation anaérobie du méthane (AOM)	38
II-3-1 – La diversité phylogénétique des ANME	39
II-3-2 – L'activité et la physiologie des consortia AOM	41
II-3-3 – La distribution et les habitats des ANME	44
II-4 – La diversité des lignées d' <i>Archaea</i> incultivées dans les sédiments marins	45
III - Objectifs	50
III - Objectives (english)	51
RESULTATS	52
PREAMBULE GENERAL	53
GENERAL PRESENTATION (english)	55
CHAPITRE 1: Etude de la diversité et de l'activité des méthanogènes dans les sédiments de centre actif de volcans de boue de la Mer Méditerranée	56
Préambule	57
Article 1: Methanogenesis in the active center of the Amsterdam mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	58
Article 2: Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the center of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	83
CHAPITRE 2: Etude de la diversité des populations <i>Archaea</i> dans des sédiments hypersalés associés avec un tapis orange du volcan de boue Napoli	112
Préambule	113
Article: Metabolically active archaeal populations in hypersaline sediments associated with an orange microbial mat from the Napoli Mud Volcano	114

CHAPITRE 3: Etude de la distribution des communautés d'ANME métaboliquement actives et de SRB dans les sédiments d'un pockmark en Mer de Norvège	138
Préambule	139
Article: Distribution of metabolically active anaerobic methane-oxidizing and sulfate-reducing microbial communities in the G11 Nyegga pockmark, Norwegian Sea	140
CHAPITRE 4: Etude de la diversité des communautés <i>Archaea</i> métaboliquement actives dans des sédiments peuplés de vers tubicoles en Mer de Norvège	170
Préambule	171
Article: Metabolically active <i>Archaea</i> at Cold Seep sediments populated by <i>Siboglinidae</i> tubeworms from the Storegga Slide	172
CHAPITRE 5: Etude préliminaire des communautés <i>Archaea</i> dans des sédiments associés aux zones de pockmarks du delta profond du Nil	196
I – Introduction	197
II – Résultats et Discussion	199
II-1 – Les profils de concentrations en sulfates dans les eaux interstitielles des sédiments de pockmarks du delta du Nil	199
II-2 – La distribution verticale des communautés <i>Archaea</i>	200
III – Conclusion	204
Summary (english)	206
DISCUSSION GENERALE	209
I - Distribution verticale des communautés microbiennes <i>Archaea</i>	215
II - Diversité des <i>Archaea</i> incultivées métaboliquement actives	218
II-1 - Présence d'une grande diversité d' <i>Archaea</i> incultivées métaboliquement actives	218
II-2 - Présence du groupe RC-V dans les sédiments marins	218
II-3 - Hypothèses concernant l'implication de certains groupes d'incultivés dans les cycles géochimiques du carbone et du soufre	219
III - Les communautés méthanogènes	220
III-1 - Centres actifs des volcans de boue Napoli et Amsterdam	220
III-2 - Sédiments de pockmarks ou recouverts de tapis microbiens	224
VI - Diversité des communautés <i>Archaea</i> oxydant le méthane	225
VI-1 - Diversité des <i>Archaea</i> méthanotrophes anaérobies en fonction des intensités de flux de fluides	225
VI-2 - Diversité des <i>Archaea</i> méthanotrophes anaérobies dans les sédiments de pockmarks	225
VI-3 - Distribution verticale des <i>Archaea</i> méthanotrophes anaérobies	226
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	229
CONCLUSIONS and PERSPECTIVES (english)	233
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	235
ANNEXES	246
I - ECHANTILLONNAGE	247
II – ETUDE COMPLEMENTAIRE: LA PCR-DGGE BASEE SUR LE GENE FONCTIONNEL <i>mcrA</i>	250

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN:** Acide DésoxyriboNucléique
ARN: Acide RiboNucléique
ANME: ANaerobic MEthanotroph
AOM: Anaerobic Oxidation of Methane
BSR: Bactéries Sulfato-Réductrices
DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHVE: Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal group
dsr: dissimilatory (bi)sulfite reductase
FISH: Fluorescent In Situ Hybridization
HMMV: Haakon Mosby Mud Volcano
LDS: Lake Dagow Sediment group
MBG: Marine Benthic Group
MCG: Miscellaneous Crenarchaeotic Group
mcr: methyl-coenzyme-M reductase
MG-I: Marine Group I
PCR: Polymerase Chain Reaction
RC-V: Rice Cluster V
SM1: Sippenauer Moor Group 1
SR: Sulfato-Réduction
TMEG: Terrestrial Miscellaneous Euryarcheotal Group
TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis
ZTMS: Zone de Transition Méthane-Sulfate
VAL III: Val Kotinen Lake clade III

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1: Carte répertoriant les principales zones d'émissions de fluides froids dans le monde.	3
Figure 2: Exemple de marge continentale active: la Ride Méditerranéenne.	4
Figure 3: Schéma illustrant les différents systèmes causant la migration des fluides sur les marges passives, et leur résultantes géologiques sur le plancher sous-marin.	5
Figure 4: Image tri-dimensionnelle du glissement sous-marin Storegga.	6
Figure 5: Carte bathymétrique haute-résolution du HMMV, et représentation schématique du HMMV.	7
Figure 6: Image de pockmarks sur le plancher océanique de la marge continentale ouest Africaine du delta du Niger.	8
Figure 7: Concentrations en méthane et sulfate dans les eaux interstitielles, et taux d'activités de réduction de sulfate et d'oxydation anarérobie du méthane dans les sédiments de Kattegat et Skagerrak au Danemark.	12
Figure 8: Représentation schématique des principaux processus microbiens se déroulant dans les sédiments marins des zones d'émissions de fluides froids riches en méthane et en hydrogène sulfuré.	13
Figure 9: Image sous-marine montrant des émissions de bulles de méthane sur la marge continentale Norvégienne, et représentation d'un panache de méthane et d'hydrates au dessus du HMMV.	15
Figure 10: Carottage de sédiment recouvert de tapis microbiens oranges denses associés au volcan de boue Napoli, en Mer Méditerranée, vue de plus près du sédiment échantillonné, et photographie en microscopie optique des bactéries filamenteuses.	15
Figure 11: Schéma du HMMV, distribution faunistique du HMMV, et photos des différentes zones du HMMV.	18
Figure 12: Dégradation anaérobie de la matière organique en méthane.	22
Figure 13: Arbre phylogénétique des méthanogènes.	25
Figure 14: Métabolisme énergétique chez les méthanogènes.	26
Figure 15: Voie de méthanogénèse basée sur la réduction de CO ₂ dépendant du H ₂ .	26
Figure 16: Comparaison d'arbres phylogénétiques de clones environnementaux et de méthanogènes, basé sur l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S et les gènes <i>mcrA</i> .	28
Figure 17: Le cycle du soufre dans les sédiments marins.	31
Figure 18: Voie de réduction du sulfate en sulfure d'hydrogène.	34
Figure 19: Voies biochimiques assimilatrice et dissimilatrice de réduction du (bi)sulfite (HSO ₃ ⁻) en sulfure (S ²⁻).	34
Figure 20: Comparaison des topologies des arbres phylogénétiques basés sur les gènes codant l'ARNr 16S et <i>dsrAB</i> .	37
Figure 21: Identification <i>in situ</i> d'un agrégat ANME/SRB.	39
Figure 22: Arbre phylogénétique des ANME.	40
Figure 23: Arbre phylogénétique de groupes d' <i>Archaea</i> incultivés.	46

Tableau 1: Espèces de méthanogènes isolées de sédiments marins dans les cultures de collection internationale. _____ 28

Tableau 2: Récapitulatif de taux d'activités de méthanogénèse, d'AOM, et des concentrations en méthane dans différentes zones d'émission de fluides froids. _____ 29

Tableau 3: Taux d'activités d'AOM mesurés dans différents habitats aquatiques. _____ 41

RESULTATS

Figure 24: Carte bathymétrique de la mer Méditerranée orientale situant les deux zones de pockmarks du delta du Nil central, et carte bathymétrique d'un agrandissement de la région 2A de pockmarks. _____ 198

Figure 25: Photos des échantillons PC3 et PC5 prélevés dans le delta du Nil. _____ 199

Figure 26: Profils de concentrations en sulfate dans l'eau interstitielle des sédiments des carottes PC-3 et PC-5 de la zone des pockmarks du delta du Nil. _____ 199

Figure 27: Profils DGGE des produits d'amplification des gènes codant l'ARNr 16S *Archaea* obtenus à partir de matrices ADN extraites des sédiments du delta du Nile. _____ 201

Tableau 4: Identification des gènes de l'ARNr 16S correspondant aux bandes DGGE du PC-3. _____ 201

Tableau 5: Identification des gènes de l'ARNr 16S correspondant aux bandes DGGE du PC-5. _____ 202

ARTICLES

Methanogenesis in the active center of the Amsterdam Mud Volcano, Eastern Mediterranean Sea

Figure 1. Location map showing the Anaximander Moutains, of the Eastern Mediterranean Sea, and regional 3D map of the Anaximander Moutains and focused 3D map of the Amsterdam mud volcano. _____ 59

Figure 2. Depth profiles of geochemistry and methanogenic activities in the Amsterdam mud volcano center sediments. _____ 67

Figure 3. DGGE analysis of archaeal 16S rRNA gene sequences from various sediment depths from the Amsterdam mud volcano. _____ 71

Figure 4. Distance tree showing the affiliations of Amsterdam MCR amino acid sequences. _____ 72

Table 1. Identity of dominant DGGE bands detected by nested PCR-DGGE in sediments from the center of the Amsterdam mud volcano. _____ 71

Supplementary material SM1. Depth profiles of the porewater concentrations of Mg^{2+} , Na^+ , and Ca^{2+} in the Amsterdam mud volcano centre sediments. _____ 79

Supplementary material SM2. Depth profiles of methanogenic activities in sediments from the centre of the Amsterdam mud volcano. _____ 80

Supplementary material SM3. Closest relatives of representative clones from *mcrA* gene libraries from depths 100 to 200, and 200 to 250 cmbsf of the Amsterdam mud volcano. _____ 81

<u>Supplementary material SM4</u> . Rarefaction analysis of the <i>mcrA</i> genes from 100 to 200 cmbsf depths.	82
---	----

Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the center of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea

<u>Figure 1</u> . Location map showing the Olimpi area in the Eastern Mediterranean Sea, and closer view of the Napoli mud volcano and the sampled gravity cores	84
--	----

<u>Figure 2</u> . Depth profiles of geochemistry and methanogenic activities in the Napoli mud volcano center sediments.	92
--	----

<u>Figure 3</u> . Depth profile of total prokaryotic cells in the Napoli mud volcano center sediments.	95
--	----

<u>Figure 4</u> . DGGE analysis of archaeal 16S rRNA gene sequences from various sediment depths of the Napoli mud volcano.	97
---	----

<u>Figure 5</u> . Distance tree showing the affiliations of Napoli MCR amino acid sequences.	99
--	----

<u>Table 1</u> . Identity of dominant DGGE excised bands detected by nested PCR-DGGE in the Napoli center sediments.	97
--	----

<u>Supplementary material SM1</u> . Depth profiles of the porewater concentrations of Mg ²⁺ , Na ⁺ , and Ca ²⁺ in the Napoli mud volcano centre sediments.	108
---	-----

<u>Supplementary material SM2</u> . Depth profiles of methanogenic activities in the Napoli mud volcano center sediments.	108
---	-----

<u>Supplementary material SM3</u> . Rarefaction analysis of the <i>mcrA</i> gene libraries for the 100-120, 60-80, and the 40-60 cmbsf sections.	109
--	-----

<u>Supplementary material SM4</u> . Closest relatives of representative clones from <i>mcrA</i> gene libraries from depths 40 to 60, 60 to 80, and 100 to 120 cmbsf for the Napoli mud volcano.	111
---	-----

Metabolically active archaeal populations in hypersaline sediments associated with an orange microbial mat from the Napoli Mud Volcano

<u>Figure 1</u> . Location map showing the Olimpi area in the Eastern Mediterranean Sea, and closer view on the Napoli mud volcano and the position of the sampled push core.	115
---	-----

<u>Figure 2</u> . Sulfate and chloride porewater concentration profiles for core CT-21 of the Napoli orange mat sediments.	123
--	-----

<u>Figure 3</u> . DGGE analysis of Archaeal 16S rRNA genes obtained by nested PCR from various sediment depths in the Napoli mud volcano, and dendrogram obtained from clustering analysis of DGGE banding profiles.	125
--	-----

<u>Figure 4</u> . : Phylogenetic tree of the archaeal RNA-derived 16S rRNA genes of the Napoli mud volcano.	126
---	-----

<u>Figure 5</u> . Phylogenetic analysis of MCR amino acid sequences from the Napoli sediments.	128
--	-----

<u>Supplementary material SM1</u> . Rarefaction analysis of the <i>mcrA</i> and RNA-derived 16S rRNA gene libraries.	134
--	-----

<u>Supplementary material SM2</u> . Closest relatives of representative clones from the RNA-derived 16S rRNA gene library from depths 0 to 4 cmbsf of the Napoli sediments.	135
---	-----

<u>Supplementary material SM3</u> . Closest relatives of representative clones from <i>mcrA</i> gene libraries from sections 2 to 4 and 8 to 10 cmbsf, of the Napoli sediments.	137
---	-----

Diversity of metabolically active anaerobic methane-oxidizing and sulfate-reducing microbial communities in the G11 Nyegga pockmark, Norwegian Sea

Figure 1. Map showing the location of the G11 Nyegga pockmark within the Storegga Slide, and oblique view of the G11 and G12 pockmarks, and closer view of the G11 pockmark. _____ 141

Figure 2. Sulfate and chloride porewater concentrations with depth in push core CT22 of the G11 Nyegga pockmark sediment. _____ 149

Figure 3. DGGE profile of archaeal 16S rRNA PCR fragments from DNA extracted from the G11 Nyegga pockmark sediments. _____ 151

Figure 4. Phylogenetic tree based on translated partial amino acid sequences of the *mcrA* genes. _____ 152

Figure 5. Phylogenetic tree based on translated partial amino acid sequences of the *dsrB* genes. _____ 154

Figure 6. Phylogenetic tree based on RNA-derived archaeal 16S rRNA gene sequences. _____ 156

Table 1. Identity of dominant archaeal DGGE bands detected by nested PCR in the G11 Nyegga pockmark sediments. _____ 151

Supplementary material SM1. Rarefaction analysis of the *mcrA*, *dsrB*, and RNA-derived 16S rRNA gene libraries. _____ 166

Supplementary material SM2. Representative clones of the *mcrA* gene libraries. _____ 167

Supplementary material SM3. Representative clones of the *dsrB* gene libraries. _____ 168

Supplementary material SM4. Representative clones of the RNA-derived 16S rRNA 0 to 4 cmbsf sediment section gene library. _____ 169

Metabolically active Archaea at Cold Seep sediments populated by *Siboglinidae* tubeworms from the Storegga Slide

Figure 1. Map of the Storegga Slide at the Norwegian margin, with indication of the sampling area of the push core CT-9. _____ 173

Figure 2. Sulfate and chloride profiles for core CT-9 of the Storegga Slide sediments. _____ 180

Figure 3. DGGE analysis of archaeal 16S rRNA gene sequences from various sediment depths at the Storegga Slide by nested PCR, and Dendrogram from cluster analysis of DGGE banding profiles. _____ 183

Figure 4. Distance trees showing the affiliations of Storegga Slide *Crenarchaeota*-related 16S rRNA genes. and *Euryarchaeota*-related 16S rRNA genes. _____ 186

Table 1. Closest 16S rRNA gene sequences matches to the excised dominant DGGE bands using the NCBI BLASTN search. _____ 182

Supplementary material SM1. Rarefaction analysis of the RNA-derived 16S rRNA gene libraries, of the 0-6 and 6-8 cmbsf sections. _____ 192

Supplementary material SM2. Closest relatives of representative clones from RNA-derived archaeal 16S rRNA gene libraries from depths 0 to 6 and 6 to 8 cmbsf. _____ 195

DISCUSSION GENERALE

<u>Figure 28</u> : Représentation schématique montrant la diversité et la distribution des communautés microbiennes observées.	212
<u>Figure 29</u> : Arbre phylogénétique illustrant les lignées d' <i>Archaea</i> incultivées et métaboliquement actives.	213
<u>Figure 30</u> : Phylogénie des gènes <i>mcrA</i> des principales lignées d' <i>Archaea</i> méthanogènes et méthanotrophes basée sur l'analyse des acides aminés.	214
<u>Figure 31</u> : Représentation schématique des processus microbiens potentiellement impliqués dans le cycle du méthane.	214

ANNEXES

<u>Figure 32</u> : Schéma représentant les différents outils utilisés pour récolter les échantillons de sédiment lors des campagnes océanographiques.	247
<u>Figure 33</u> : Gel DGGE (gradient de dénaturation 20%-80%), de produits PCR <i>mcrA</i> obtenus à partir de matrices ADN extraites du sédiment CT-16, et de cultures pures de méthanogènes.	251
<u>Figure 34</u> : Gels DGGE (gradient de dénaturation 20%-60%), de produits PCR <i>mcrA</i> obtenus à partir de matrices ADN extraites du sédiment CT-16, et de cultures pures.	252
<u>Figure 35</u> : Gels TGGE (gradient de dénaturation 59°C à 69°C) de produits PCR <i>mcrA</i> obtenus à partir de matrices ADN extraites du sédiment CT-16, et de cultures pures.	253
<u>Figure 36</u> : Arbre phylogénétique construit à partir d'alignements de séquences protéiques d'une séquence consensus du MCR.	255
<u>Figure 37</u> : Positionnement des différentes paires d'amorces ciblant des fragments du gène <i>mcrA</i> , par rapport au gène <i>mcrA</i> .	255
<u>Figure 38</u> : Gel DGGE avec un gradient de dénaturation 20%-60%, de produits PCR <i>mcrA</i> , utilisant un couple d'amorces marquées, obtenus à partir de matrices ADN de cultures pures de méthanogènes.	257
<u>Tableau 6</u> : Liste des échantillons récoltés lors des campagnes VICKING et MEDECO.	249
<u>Tableau 7</u> : Alignement obtenu à partir des séquences protéiques du MCR encadrées par la séquence consensus choisie.	254
<u>Tableau 8</u> : Analyse OligoCheck des amorces MA-F/MA-R montrant les pourcentages de couverture de banques pour les 4 ordres connus de méthanogènes.	256

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Cette thèse a été menée dans le laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE, UMR 6197), au centre Ifremer de Brest, au sein du groupe "Marges continentales". Cette étude portait sur l'étude de la diversité microbienne et le fonctionnement des écosystèmes associés aux zones d'émissions de fluides froids au niveau de marges continentales européennes. Ce travail s'inscrit dans un vaste projet européen HERMES (Hotspot Ecosystems Research on the Margins of European Seas, <http://www.eu-hermes.net>, 2005-2009) qui a débuté en avril 2006 et s'est terminé en avril 2009.

Les marges continentales européennes s'étendent le long de l'océan Atlantique, de l'Arctique à la marge Ibérienne, et de l'ouest de la Mer Méditerranée à l'est en passant par la Mer Noire. Les marges continentales sont des environnements complexes et variés, comprenant des écosystèmes chimiosynthétiques riches en méthane. Le réchauffement climatique en cours depuis le début de l'ère industrielle est dû aux gaz à effet de serre et principalement le CO₂. Cependant, à masse égale, le méthane est un gaz à effet de serre 25 fois plus nocif parce qu'il retient les rayons infrarouges émis par la terre, responsables du réchauffement de la planète. Il apparaît donc important de déterminer les réponses potentielles de ces écosystèmes riches en méthane aux changements environnementaux. Par conséquent, la connaissance et la compréhension de la biodiversité et des processus biologiques et biogéochimiques associés aux écosystèmes des marges continentales sont des enjeux majeurs.

I – LES SEDIMENTS MARINS DANS LES HABITATS RÉDUITS

Les habitats réduits dans les sédiments des océans, des lacs ou des rivières, sont uniques et renferment une vaste biodiversité. En l'absence de lumière, diverses communautés chimiosynthétiques utilisent des composés inorganiques (comme le méthane) comme source d'énergie et de carbone. Les habitats réduits dans les sédiments marins sont caractérisés par une absence d'oxygène et des fortes concentrations en composés réduits tels que les sulfures. Les sources hydrothermales ont été parmi les premiers écosystèmes étudiés dans l'océan profond (Corliss, 1979). Dix ans après, un autre type d'écosystème basé sur la chimiosynthèse a été découvert: les zones d'émissions de fluides froids ou "cold seps" (Paull *et al.*, 1984; Suess *et al.*, 1985). Ces zones sont parmi les plus diverses des environnements réduits, d'un de vue géologique. Elles sont caractérisées par des flux de fluides ascendant qui ne sont pas induits par une activité hydrothermale. Dans ces écosystèmes, sulfures et méthane sont présents en fortes concentrations, et soutiennent le développement de communautés chimiosynthétiques diversifiées. Elles sont largement distribuées dans le monde (Figure 1), et présentes aussi bien sur des marges continentales actives que sur des marges passives, mais également au niveau de lacs ou de rivières.

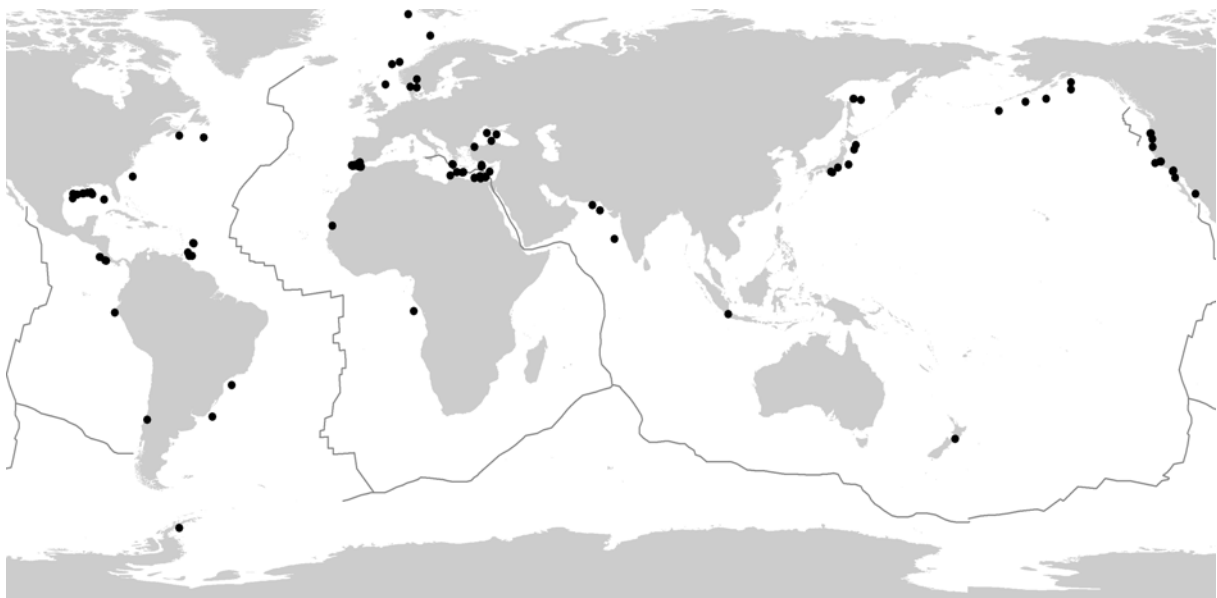


Figure 1: Carte répertoriant les principales zones d'émissions de fluides froids le monde. Carte effectuée par Bénédicte Ritt.

I-1 – Les zones d'émissions de fluides froids (ou "cold seeps"): contexte géologique

Les marges continentales sont des frontières entre une plaque continentale et une plaque océanique. On distingue deux types de marges: actives ou passives. Les marges actives sont des zones de subduction (passage d'une plaque océanique sous une plaque continentale, Figure 2) au niveau desquelles est observée une activité géodynamique intense (volcanique, sismique ...). Les marges passives correspondent à la transition entre la croûte terrestre et la croûte océanique, et sont des zones stables situées dans des régions inactives.

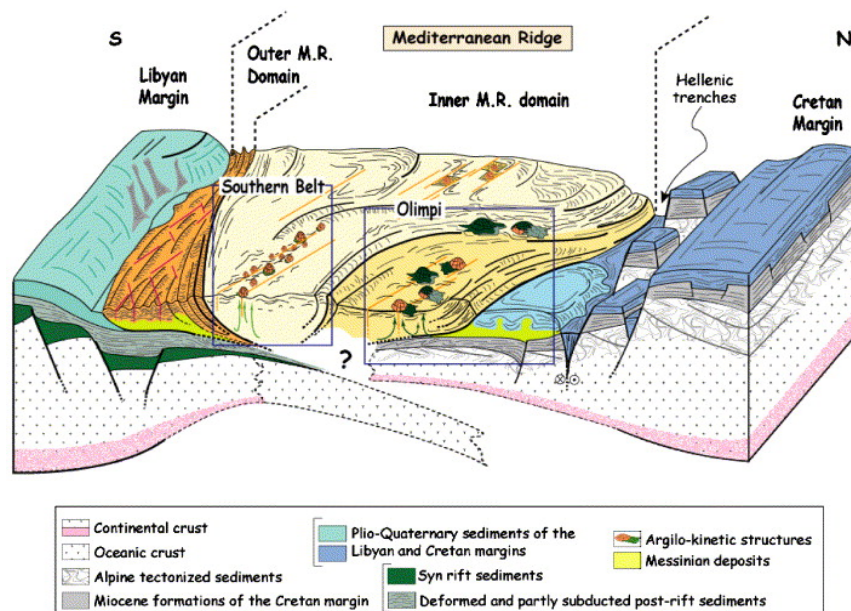


Figure 2: Exemple de marge continentale active: la Ride Méditerranéenne (Huguen *et al.*, 2005).

De nombreuses études ont mis en évidence une circulation active de fluides dans la couverture sédimentaire des marges continentales, des côtes aux plaines abyssales. Contrairement aux sources hydrothermales situées sur les dorsales océaniques, les fluides issus des marges continentales ont des températures basses. C'est pourquoi ces zones ont été appelées zones d'émission de fluides froids ou "cold seeps".

Les marges continentales sont des environnements dynamiques, dans lesquels de nombreux mécanismes entraînent la migration de fluides dans les bassins sédimentaires (Chaduteau, 2008). Les émissions de fluides froids se manifestent dans des zones où l'eau interstitielle enrichie en composés réduits,

migre dans les couches sédimentaires sous l'effet de la pression. La principale force qui engendre la migration des fluides est la compaction des roches sédimentaires et un mouvement de convergence des plaques tectoniques entraînant des phénomènes de surpression (excès de pression sur les fluides interstitiels) (Levin, 2005). La déshydratation de minéraux argileux pourrait entraîner également la migration et l'expulsion de grandes quantités de fluides (Berndt, 2005). Ainsi, les fluides remontent le long de zones poreuses et perméables telles que les fractures, les failles ou les couches de boue (Levin, 2005). Il peut en résulter la formation de réservoirs superficiels comme les hydrates de gaz, ou profonds comme les réservoirs pétroliers. Les fluides en surpression et plus ou moins denses sont composés principalement d'hydrocarbures organiques tels que le méthane et le pétrole (Levin, 2005).

Lorsque la circulation et l'expulsion des fluides au niveau du plancher sous-marin sont plus intenses, leur émission à partir de sources profondes est souvent associée à des formations géologiques spectaculaires (Figure 3), telles que les zones de glissement ou de failles, les volcans de boue, ou les pockmarks (ou "marque de petite vérole" en français) (Levin, 2005).

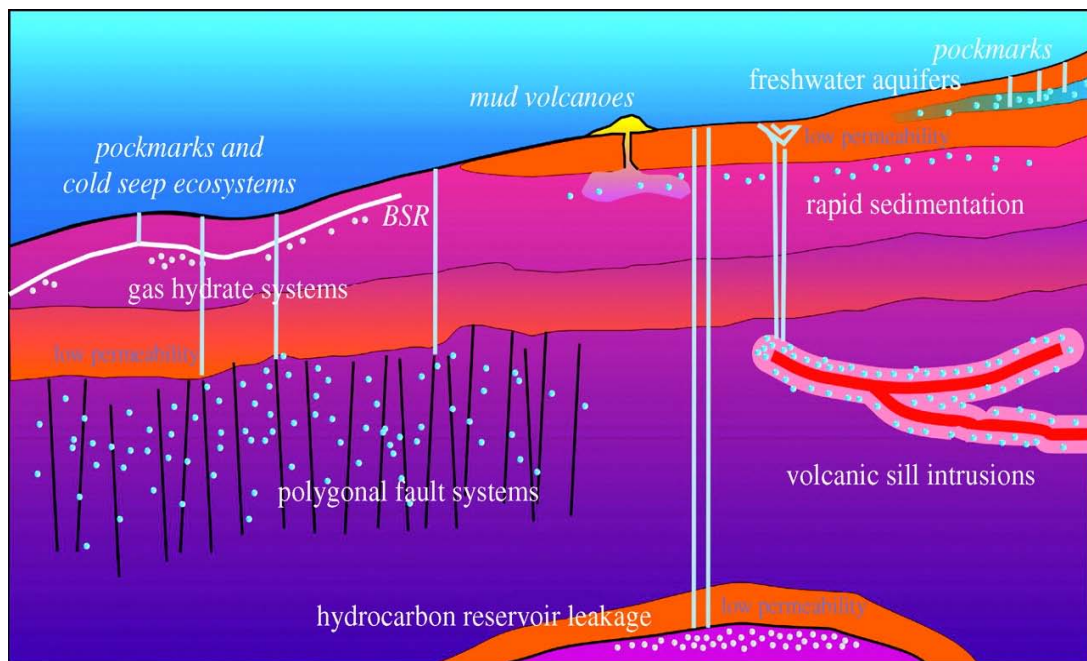


Figure 3: Schéma illustrant les différents systèmes causant la migration des fluides sur les marges passives, et leur résultantes géologiques sur le plancher sous-marin (Berndt, 2005).

I-1-1 – Les zones de glissement

Les zones de glissement sont provoquées par un transfert de sédiments de la pente continentale vers l'océan profond. Les sédiments provenant des continents (transportés par les rivières) et du plateau continental (par érosion et transportés par les courants océaniques et les orages) se déposent sur la couche sédimentaire supérieure, où ils sont mélangés aux sédiments pélagiques. Cependant à cause de l'instabilité des pentes continentales, ces dépôts sont souvent acheminés plus profondément, menant à des événements de glissement sous-marin. Les causes à l'origine de ces glissements peuvent être reliées aux caractéristiques géologiques des matériaux de la zone de glissement (surpression due à des dépôts rapides ou présence d'une couche sédimentaire faible). Il a aussi été montré qu'un tremblement de terre était nécessaire au déclenchement de ces glissements sous-marins (Masson *et al.*, 2006). Un exemple de glissement sous-marin géant est le glissement appelé Storegga, en Mer de Norvège (Figure 4).

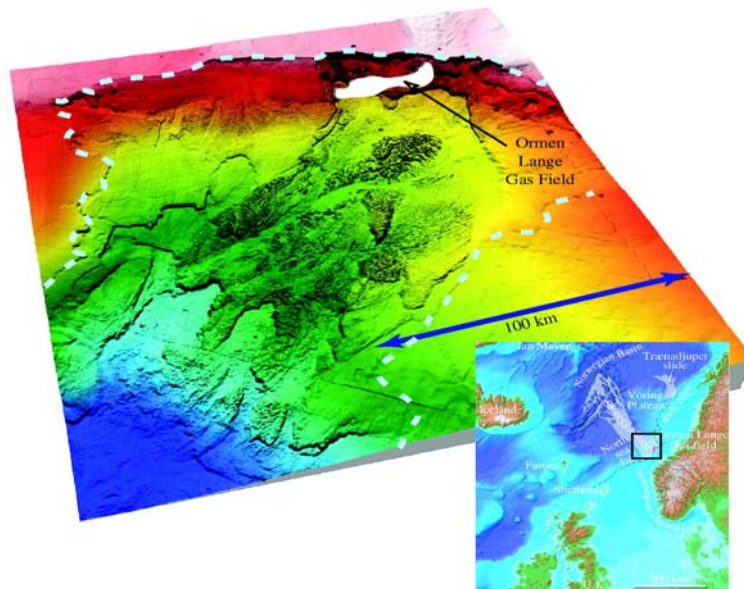


Figure 4: Image tri-dimensionnelle du glissement sous-marin Storegga, basée sur des cartes de bathymétrie (Masson *et al.*, 2006).

I-1-2 – Les volcans de boue

Les volcans de boue sous-marins (comme le volcan de boue Haakon Mosby HMMV en Mer de Norvège, Figure 5) sont généralement circulaires avec des diamètres allant de plusieurs mètres à quelques kilomètres. Ils possèdent un centre

actif à partir duquel des fluides riches en gaz et de la boue sont expulsés en provenance des couches sédimentaires anciennes et profondes. Les gaz expulsés des volcans de boue sont composés essentiellement de méthane (de 58 à 98 %) bien que certains volcans émettent des gaz contenant du dioxyde de carbone ou des gaz enrichis en azote. La formation des volcans de boue peut avoir plusieurs causes ou être la résultante d'une combinaison de ces causes : (i) des accumulations de gaz dans les couches sédimentaires profondes et une pression anormalement élevée, (ii) la présence de failles, d'activité sismique ou de compression tectonique latérale, (iii) la décomposition d'hydrates de gaz (cf paragraphe I-1-4), et (iv) des flux de fluides le long des zones de fractures (Milkov, 2000). Les volcans de boue sous-marins présentent parfois de violentes éruptions, mais la plupart du temps leur expansion est calme et progressive, se traduisant par des émissions graduelles et massives de boue semi-liquide (Dimitrov, 2003a). Le nombre de volcans de boue sous-marins dans le monde est estimé entre un millier et un million.

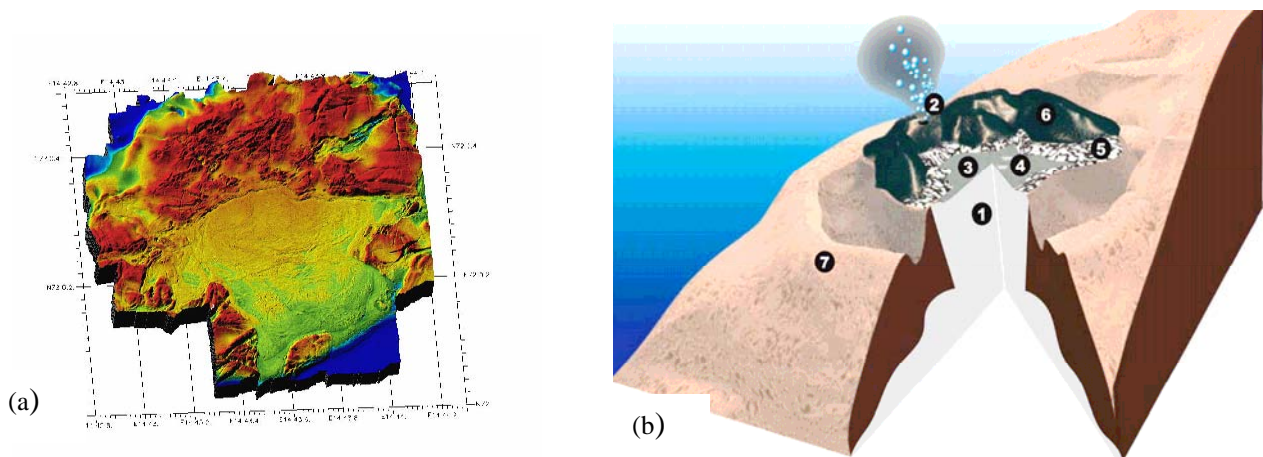


Figure 5: (a) Carte bathymétrique haute-résolution du HMMV (A. Deschamps, A. Normand). (b) Représentation schématique du HMMV (Niemann *et al.*, 2006).

I-1-3 – Les pockmarks

Les pockmarks sont des dépressions sous-marines coniques (exemple d'une zone de pockmarks de la marge continentale ouest Africaine, Figure 6) qui varient en taille (de un à plusieurs centaines de mètres) et en profondeur (de un à plus de dix mètres). Les pockmarks sont le résultat visible en fond de mer des processus de dégazage qui se produisent au niveau des sources profondes vers les sédiments des couches superficielles. En effet, les pockmarks se situent le plus souvent à proximité de volcans de boue, et le long de lignes de failles et des sites d'émissions actives de

fluides. Les gaz émis par les volcans de boues permettent la formation de voies de passage spécifiques à travers la boue et le sédiment pélagique. Des réservoirs peu profonds peuvent alors se former quand ces voies sont scellées par des dépôts imperméables de boue fraîche, et se remplissent de gaz venant des profondeurs. La pression augmente alors peu à peu jusqu'à l'apparition d'un événement déclencheur tel qu'un tremblement de terre, entraînant alors l'expulsion de sédiments et de gaz et créant ainsi un pockmark. Une fois que la voie de passage a été créée, elle devient une route préférentielle pour les gaz vers le plancher sous-marin. Des conduits additionnels peuvent s'ajouter si la voie principale est bloquée. Ce phénomène peut expliquer l'apparition de groupes de pockmarks dans un même secteur. Les pockmarks peuvent rester actifs, émettant du gaz à faibles débits pendant de longues périodes, ou quiescents (Dimitrov et Woodside, 2003b).

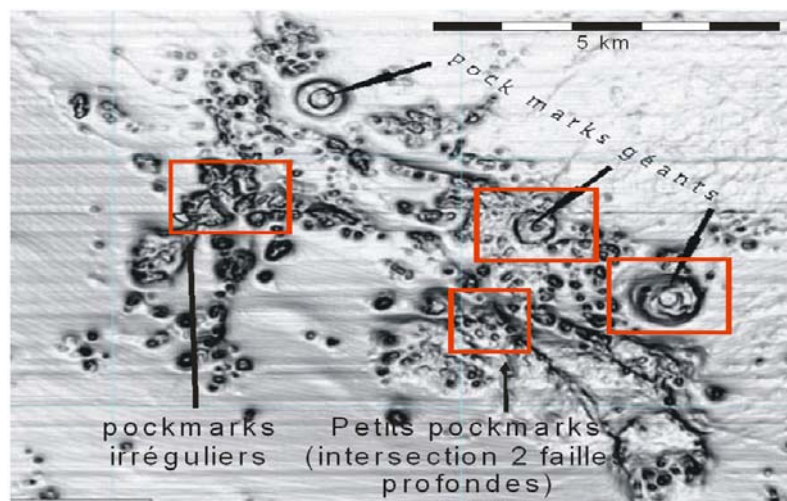


Figure 6: Image de pockmarks sur le plancher océanique de la marge continentale ouest Africaine du delta du Niger, obtenue par échosondeur à faisceaux multiples (Rapport interne Ifremer).

I-1-4 – Le méthane dans les sédiments des zones d'émissions de fluides froids

Le méthane est un gaz à effet de serre important qui contribuerait à 15 % au réchauffement global de notre planète (Rodhe, 1990). En effet, à masse égale, le méthane est un gaz à effet de serre 25 fois plus puissant que le dioxyde de carbone (Rusanov *et al.*, 2002). Des estimations récentes suggèrent que les sédiments marins produisent de 85 à 300 Tg de méthane par an (Knittel et Boetius, 2009). La plus grande partie de ce méthane est stockée provisoirement dans les sédiments

marins qui couvrent approximativement 70 % de la surface terrestre (Kvenvolden, 1988). Ainsi de grandes quantités de méthane sont piégés dans les sédiments marins sous forme de gaz libre, dissout, ou emprisonné dans la glace sous forme d'hydrates de gaz. Les hydrates de gaz sont composés de molécules de méthane emprisonnées dans une cage cristalline de molécules d'eau. Ils se forment naturellement lorsque la concentration en méthane dissout est à saturation dans l'eau interstitielle des sédiments, et dans des conditions spécifiques de pression élevée et de températures basses (Brown *et al.*, 2006). Cependant, les émissions de méthane d'origine marine sont moins significatives (environ 4% des émissions globales) que dans d'autres milieux (rizières, terrestres), parce que le méthane est consommé par des communautés microbiennes qui jouent ainsi un rôle de biofiltre, avant d'atteindre l'hydrosphère puis l'atmosphère (Rusanov *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2006). En effet, plus de 90 % du méthane provenant des sédiments marins est consommé dans les couches anoxiques des sédiments (Knittel et Boetius, 2009).

Dans les sédiments marins, le méthane peut avoir une origine biogénique, thermogénique ou mixte. Cependant, des données isotopiques suggèrent que le méthane a principalement une origine biogénique dans ces milieux. En effet, des calculs de rapports isotopiques du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) du méthane permettent de déterminer l'origine de ce méthane. Le méthane d'origine biogénique possède des signatures isotopiques comprises en - 60‰ et - 80‰ (Kvenvolden, 1995). Le méthane d'origine thermogénique (ou abiogénique) est produit dans les couches profondes des sédiments par craquage de la matière organique à haute température. Le méthane d'origine biogénique est le résultat du processus de méthanogenèse, qui est l'étape finale de fermentation de la matière organique dans les sédiments. Ce métabolisme est réalisé par des *Archaea* méthanogènes.

L'expulsion de fluides enrichis en méthane au niveau du plancher sous-marin favorise le développement de communautés biologiques chimiosynthétiques complexes (tapis microbiens, vers tubicoles, bivalves, et autres organismes ... Sassen *et al.*, 1998). L'observation de panaches de bulles de gaz et la présence de communautés chimiosynthétiques sont donc des preuves de présence de zones d'émissions de fluides froids.

II-2 – Les zones d'émissions de fluides froids: géochimie des sédiments et écosystèmes chimiosynthétiques

II-2-1 – La géochimie des sédiments des marges continentales

Les sulfures (cf paragraphe II-2) jouent un rôle central dans les cycles biogéochimiques des sédiments marins (Omorgie *et al.*, 2008), car ils sont utilisés comme donneur d'électrons par une variété d'organismes aérobies et anaérobies. Dans les sédiments marins, l'hydrogène sulfuré est produit au cours de la dégradation anaérobie de la matière organique couplée à la réduction des sulfates (Sahling *et al.*, 2002). Ces réactions sont à l'origine d'une série de processus biogéochimiques qui relient les cycles du carbone et du soufre dans ces écosystèmes (Omorgie *et al.*, 2008).

La matière organique dissoute, principalement issue des organismes vivants parmi lesquels le phytoplancton, est un paramètre essentiel du milieu marin. Les apports en particules organiques vers les sédiments des océans du monde sont estimés entre 5 à 10 milliards de tonnes (Jorgensen et Kasten, 2006). Le matériel sédimentaire fraîchement déposé après un "bloom" phytoplanctonique forme souvent une fine couche de détritus à l'interface eau-sédiment. Sous l'effet de la bioturbation et des invertébrés benthiques qui se nourrissent des matières détritiques, les particules organiques sont progressivement enfouies dans le sédiment. La macrofaune benthique dégrade les détritus qui n'ont pas été consommés par les microorganismes dans la colonne d'eau. Dans les sédiments marins beaucoup de microorganismes acquièrent de l'énergie par l'oxydation de la matière organique en présence d'un oxydant externe (ou accepteur d'électrons) (Jorgensen et Kasten, 2006). D'un point de vue thermodynamique, l'oxygène est l'accepteur d'électrons le plus favorable dans le cas de la respiration aérobie. Une zonation verticale des processus microbiens s'établit en fonction de l'oxygénation des couches sédimentaires. Une succession de types respiratoires microbiens se présente alors selon un gradient d'oxydo-réduction en fonction de l'enfouissement. Dans les couches sédimentaires plus profondes, où le sulfate est épuisé, il y a une oxydation incomplète du carbone organique, et une dégradation en CH₄ (Jorgensen et Kasten, 2006). Le méthane s'accumule ainsi dans les sédiments profonds, desquels il remonte doucement vers la zone sédimentaire riche en sulfate, couches dans

lesquelles il est converti en CO_2 . Donc, la matière organique initialement déposée sur le plancher participe à un cycle de dégradation progressif dans les sédiments marins.

Dans les couches sédimentaires où l'oxygène a été consommé par les processus microbiens de respiration aérobie, le sédiment devient anoxique, et les populations microbiennes utilisent d'autres accepteurs d'électrons pour la minéralisation de la matière organique. Dans un ordre d'acquisition énergétique décroissante, on trouve notamment : le nitrate (NO_3^-), les oxydes de manganèse (Mn(IV)), les oxydes de fer (Fe(III)), et le sulfate (SO_4^{2-}). La couche sédimentaire où prédomine les réductions de NO_3^- , Mn(IV) , et Fe(III) est appelée zone suboxique.

Zone de transition sulfate-méthane (ZTMS)

Afin d'illustrer le contexte géochimique de nos études, l'observation de profils géochimiques dans les eaux interstitielles des sédiments marins dominés par transports diffusifs, permettent de déterminer trois zones distinctes:

- (i) des sédiments de surface riches en sulfate,
- (ii) une interface dite zone de transition sulfate-méthane, et
- (iii) plus profondément dans le sédiment, la concentration en sulfate diminue alors que la concentration en méthane augmente.

Les mesures d'activité microbiennes montrent que dans les sédiments riches en sulfate la réduction du sulfate par des bactéries sulfato-réductrices (BSR) est quantitativement l'activité anaérobie de décomposition de la matière organique dominante dans les sédiments de surface. Cette observation est vraie pour la plupart des sédiments marins et dépend de la quantité et de la qualité de la matière organique potentiellement dégradable. A l'interface des couches montrant à la fois du sulfate et du méthane, la zone de transition sulfate-méthane (ZTMS; Valentine, 2002) est le siège de processus d'oxydation anaérobie du méthane couplés principalement à la réduction du sulfate.

En dessous de cette zone de transition, le sulfate est appauvri voir nul et la concentration en méthane augmente avec l'enfouissement. Dans ces sédiments, la méthanogenèse, étape finale de la fermentation de la matière organique est quantitativement dominante (Figure 7).

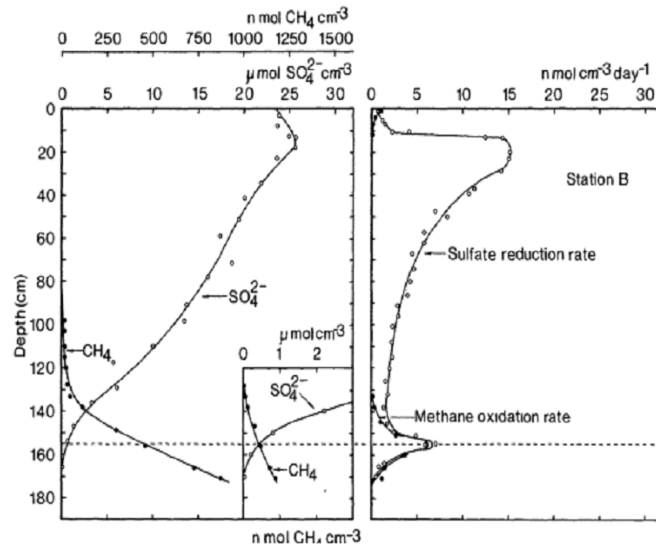


Figure 7: Concentrations en méthane et sulfate dans les eaux interstitielles, et taux d'activités de réduction de sulfate et d'oxydation anaérobie du méthane dans les sédiments de Kattegat et Skagerrak au Danemark. Les insertions dans les coins inférieurs montrent les concentrations en sulfate et méthane dans la ZTMS. Schémas tirés de Iversen *et al.* (1985).

Le sulfate présent dans l'eau de mer est transporté par diffusion dans les sédiments superficiels où il est réduit par les BSR (Ferry et Lessner, 2008). Dans les couches plus profondes, la méthanogénèse est plus importante que la sulfato-réduction. Les BSR concurrencent efficacement les méthanogènes dans les sédiments marins riches en sulfate pour le H_2 et l'acétate en raison d'une plus grande affinité pour ces composés. Dans les couches superficielles des sédiments, la méthanogénèse est limitée et représente moins de 0,1% du recyclage du carbone total.

La ZTMS est aussi la zone où se produit l'oxydation anaérobie du méthane (AOM). Ce processus est effectué par des *Archaea* méthanotrophes anaérobies appelées ANME (ANAerobic METHanotroph). Il existe aussi une oxydation aérobie du méthane dans les couches oxiques des sédiments de surface. Mais ce processus apparaît comme une voie mineure d'oxydation du méthane.

Les sulfures produit par l'AOM (HS^-) peuvent ensuite être utilisés par des organismes sulfo-oxydants. L'oxydation du sulfure conduit à la formation de sulfate, recyclant ainsi le stock de sulfate disponible pour les BSR (Figure 8).

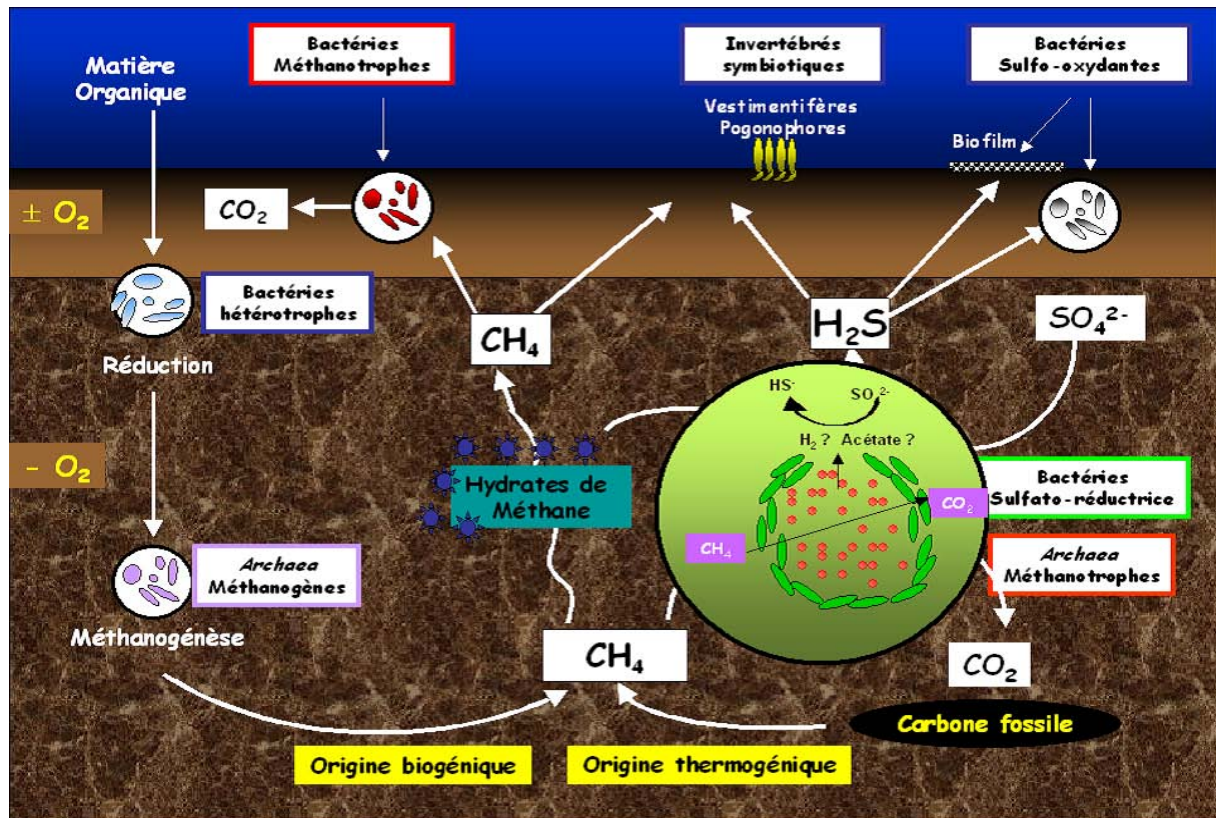


Figure 8: Représentation schématique des principaux processus microbiens se déroulant dans les sédiments marins des zones d'émissions de fluides froids riches en méthane et en hydrogène sulfuré. D'après Sébastien Duperron.

II-2-2 – Les écosystèmes chimiosynthétiques des marges continentales: indicateurs d'émissions de fluides froids

Il a fréquemment été postulé que la colonisation par les différentes communautés biologiques chimiosynthétiques possédant des composantes trophiques distinctes reflétaient des différences dans les flux de fluides et les taux d'advection dans les zones d'émission de méthane (Treude *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2004; Orphan *et al.*, 2004). En effet, les sites d'émissions de fluides sont des environnements dynamiques montrant une géochimie hétérogène et des intensités de flux de fluides qui varient dans le temps et l'espace. Une variété de processus physico-chimiques crée et régule les émissions de fluides et de gaz, le long des failles, la dissociation des hydrates de gaz, la précipitation des carbonates, et la compaction sédimentaire (Orphan *et al.*, 2004).

Ces communautés chimiosynthétiques dépendent de la disponibilité en l'hydrogène sulfuré (H₂S) et en méthane comme sources d'énergie. Ces communautés sont donc des indicateurs de la présence de composés réduits. Les

espèces chimioautotrophes les plus communes appartiennent aux microorganismes tels que *Beggiatoa*. Puisque la chimioautotrophie repose sur la disponibilité des composés réduits, on peut s'attendre à ce que l'environnement chimique influence la distribution des espèces (Sahling *et al.*, 2002).

Dans ce travail de recherche doctorale, nous proposons de classer les habitats en fonction des observations biologiques et des flux de fluides. Trois catégories différentes peuvent être définies:

- émissions directes de fluides sur le plancher sous-marin non colonisé par des communautés biologiques visibles en surface
- sédiments recouverts à leur surface de tapis microbiens, et
- sédiments peuplés par des communautés animales.

Les zones d'émission directe de fluides et de gaz dont le méthane, sont déterminées par l'observation de panaches de bulles de gaz à l'aide de sondeurs et de vidéos (Figure 9a et 9b). L'observation de panaches de gaz constitués principalement de méthane est la conséquence directe de la circulation de fluides dans les sédiments. Les gaz dans les eaux interstitielles, incluant le méthane peuvent migrer selon plusieurs mécanismes. Lorsque la concentration des gaz ne dépasse pas le seuil de saturation, la diffusion et l'advection sont les deux modes de transport. Si le seuil de saturation est atteint, des bulles vont se former et remonter par flottabilité à travers la porosité ou le long de discontinuités. Ce dernier mécanisme semble être le mode de transport des gaz le plus efficace. Le méthane, ainsi que les fluides associés provenant de réservoirs profonds remontent vers les couches superficielles du sédiment en traversant des conduits. Les hydrates de gaz naturels s'accumulent dans des conditions spécifiques de pression et de température et d'une quantité suffisante de méthane (zone de stabilité des hydrates, GHSZ). (Treude *et al.*, 2003). Ces conduits correspondent souvent aux centres actifs de volcans de boue sous-marins, au niveau desquels les flux de fluides de boue et de gaz sont généralement très élevés. Par exemple, les flux de fluide dans le centre actif volcan de boue Haakon Mosby, sur la marge continentale norvégienne sont estimés entre 1,3 et 6,0 mètre par an. La conséquence de la migration de fluide et de gaz est l'établissement d'un gradient naturel du centre du volcan vers la périphérie,

représentant une succession de faciès sédimentaires propices ou non au développement de communautés chimiosynthétiques.

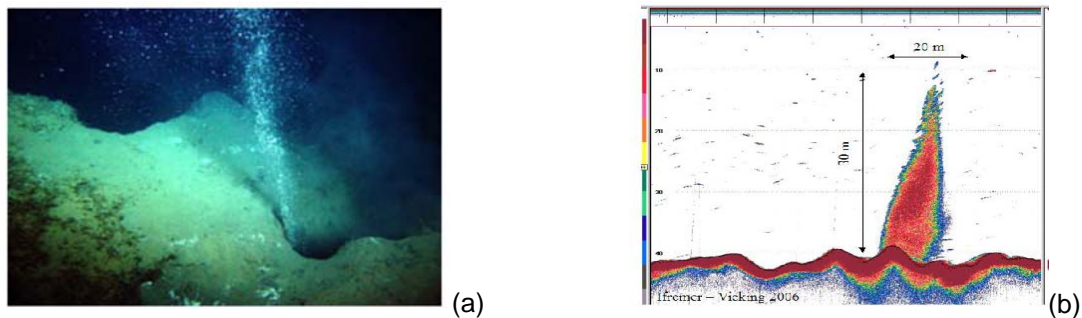


Figure 9: (a) Image sous-marine montrant des émissions de bulles de méthane accompagnées probablement de paillettes d'hydrates dans le HMMV, sur la marge continentale Norvégienne. (b) Représentation d'un panache de méthane et d'hydrates au dessus du HMMV, suivi à l'aide d'un échosondeur EK60 du robot Victor 6000. Images obtenues au cours de la campagne Ifremer VICKING.

Les tapis microbiens se développent sur les sédiments exposés aux fluides froids. Les tapis denses et épais sont formés classiquement de bactéries géantes filamenteuses (exemple en Figure 10). Il s'agit de bactéries microaérophiles, sulfoxydantes, et autotrophes affiliées le plus souvent affiliées à l'ordre des *Thiotricales* (genre *Beggiatoa* par exemple). Ces dernières forment généralement des tapis denses et épais au dessus des zones d'émission d'hydrocarbures et dans les habitats riches en H_2S (Michaelis *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2004; Heijs *et al.*, 2005). Les organismes appartenant au genre *Beggiatoa* sont capables de se mouvoir par glissement notamment en s'enfonçant dans les sédiments lorsque les conditions environnementales sont moins favorables. Les filaments de *Beggiatoa* sont remplis de granules de soufre caractéristique de leur couleur jaune-orange (Omeregie *et al.*, 2008).



Figure 10: (a) Carottage de sédiment recouvert de tapis microbiens oranges denses associés au volcan de boue Napoli, en Mer Méditerranée. (b) Vue de plus près du sédiment échantillonné recouvert par un tapis composé de filaments de couleur orange. (c) Photographie en microscopie optique (x40) des bactéries filamenteuses qui composent le tapis orange. Photos prise lors de la campagne Ifremer MEDECO en 2007.

Sur Hydrate Ridge (aux larges de l'Oregon) par exemple, les sédiments superficiels colonisés par des populations de bactéries filamenteuses appartenant au genre *Beggiatoa*, sont exposés à des flux de fluides variables entraînant une disponibilité en sulfures également fluctuante. Un tel changement dynamique de l'écosystème nécessite que les organismes du genre *Beggiatoa* puissent s'adapter rapidement. En effet, ces bactéries sulfo-oxydantes nécessitent pour se développer des sulfures, de l'oxygène, ou du nitrate stocké à l'intérieur des cellules (Sahling *et al.*, 2002). Dans le Basin d'Eel River (aux larges de la Californie), les tapis microbiens sont exposés à des sédiments caractérisés par des fortes concentrations en méthane (Orphan *et al.*, 2004). De plus, les représentants bactériens du genre *Beggiatoa* pourraient former des structures (voiles) qui orienteraient les flux de fluides dans le sédiment afin d'optimiser leur activité métabolique (Orcutt *et al.*, 2005).

L'hydrogène sulfuré dissous dans les eaux interstitielles des sédiments marins est utilisé comme source d'énergie pour des populations de macrofaune en association symbiotique avec des bactéries chimioautotrophes (Sahling *et al.*, 2002).

Par exemple, dans les zones d'émissions de fluides froids, des vers tubicoles de la famille des Siboglinidés sont très abondants. Au niveau des sédiments de marges continentales, les Siboglinidés sont généralement fins et ont une grande longévité (Boetius, 2005). Le développement des espèces de Siboglinidés va dépendre de la disponibilité en sulfures dans leur environnement proche. Les animaux sont traditionnellement fixés et ancrés à des substrats durs comme les croûtes carbonatées (CaCO_3). Les membres des Siboglinidés ne possèdent pas de système digestif, et dépendent de bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes qu'ils abritent pour se nourrir.

Ainsi, chaque type d'habitat (émissions directes de fluides, sédiments recouverts de tapis microbiens, ou sédiments peuplés par des communautés animales) semble être caractérisé par différentes intensités de flux de fluides. Or, ces flux de fluides régulent la disponibilité en accepteurs d'électron (sulfate, oxygène) pour les communautés microbiennes sédimentaires, comme c'est le cas dans les sédiments du volcan de boue Haakon Mosby (HMMV, Niemann *et al.*, 2006).

Le volcan de boue Haakon Mosby est un exemple typique de volcan de boue actif situé sur la pente continentale Norvégienne à 1250 m de profondeur. Les caméras vidéos du robot télé opéré Victor 6000 de l'Ifremer montre que le volcan de boue se caractérise par trois zones concentriques (Figure 11) représentant trois habitats spécifiques du centre vers la périphérie (Nieman *et al.*, 2006). Les différences de débits de fluides dans les trois habitats du HMMV semblent être responsables de la zonation concentrique mais également de la diversité et du fonctionnement des communautés chimiosynthétiques associées. En effet, les flux de fluides dans les sédiments colonisés quasi exclusivement par des vers tubicoles de la famille des Siboglinidés en périphérie du volcan, sont plus faibles ($0,4 \text{ m an}^{-1}$ selon les gradients thermiques) que ceux trouvés dans le centre actif (de $1,3$ à $5,3 \text{ m an}^{-1}$) ou dans la zone intermédiaire montrant des tapis microbiens denses de bactéries (de $0,6$ à 1 m an^{-1}). Les bactéries filamenteuses constituant les tapis microbiens du HMMV sont affiliées au genre *Beggiatoa* et sont capables d'oxyder les sulfures (Niemann *et al.*, 2006). Les débits de fluides estimés dans cette zone sont 10 fois moins importants que dans la zone centrale du volcan. Les sédiments associés aux tapis de *Beggiatoa* sont dominés par des *Archaea* anaérobies qui oxydent le méthane. D'autre part, dans la périphérie du volcan, l'activité de bioventilation des vers crée une bioturbation des sédiments qui influence la répartition des microorganismes. En effet, les vers transportent le sulfate vers la base de leurs tubes, où se produisent les processus d'AOM couplé à la SR.

I-3 – La biosphère profonde

Une grande partie du méthane qui remonte au niveau des zones d'émissions de fluides froids dans les sédiments marins provient de réservoirs profonds de la biosphère souterraine. Les structures géologiques en fond de mer représentent des fenêtres ouvertes pour l'étude de la biosphère profonde. Les mouvements de fluides à travers les couches sédimentaires maintiennent des échanges dynamiques entre les écosystèmes de surface et la biosphère de subsurface.

La biosphère souterraine est présente et active jusqu'à plusieurs milliers de mètres de profondeur.

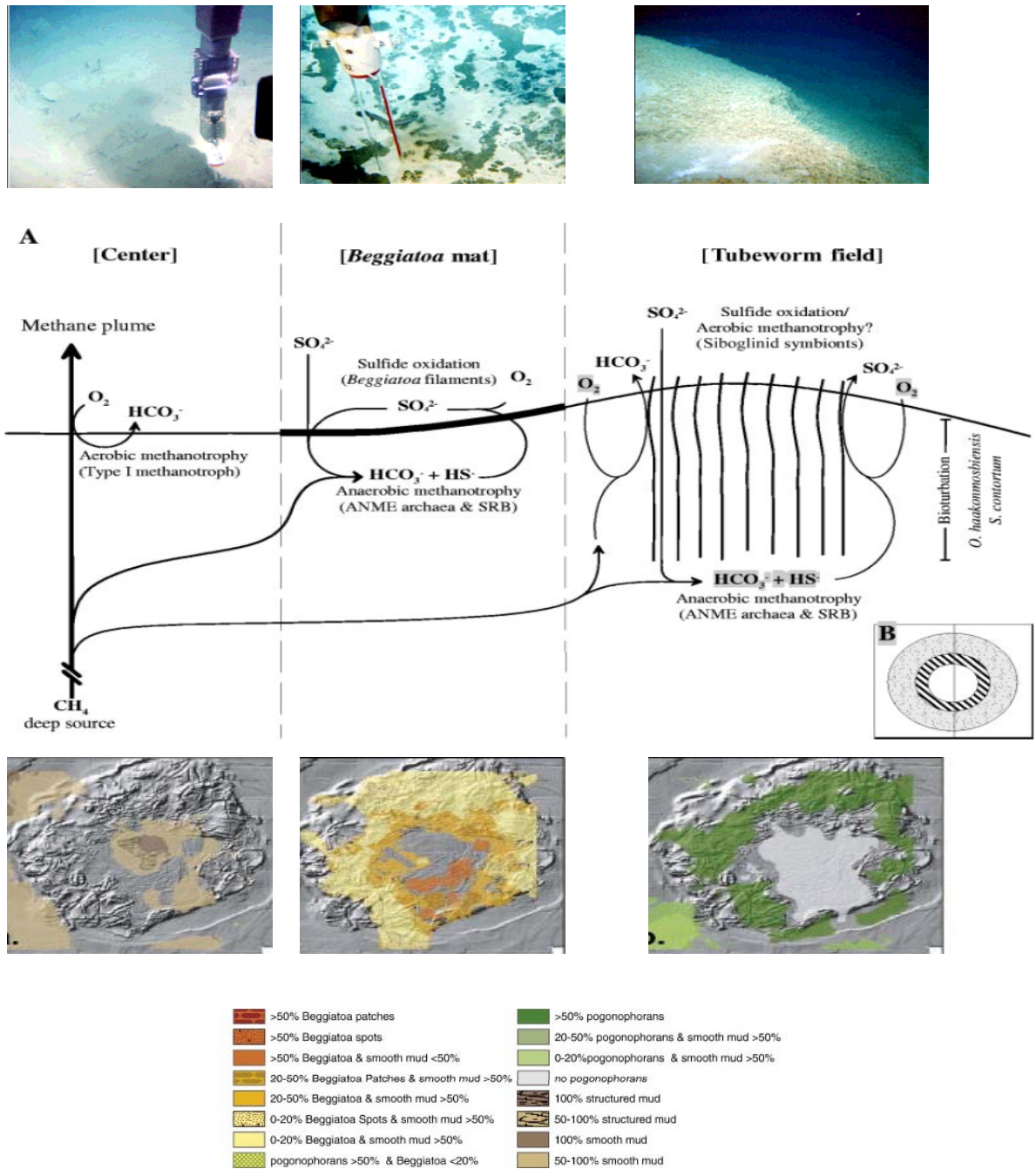


Figure 11: (I) Schéma des différents habitats déterminés sur le volcan de boue Haakon Mosby, A: Processus microbiens dominant dans les sédiments de chaque habitat, B: Zonation circulaire du HMMV, le cercle interne représente le centre, le cercle hachuré la zone de tapis et le cercle externe la zone peuplée de vers. D'après Lösekann *et al.* (2007). (II) Distribution faunistique du HMMV, (a) Zone centrale couverte de boue, (b) zone des tapis microbiens, et (c) zone des vers. D'après Jerosch *et al.* (2007). (III) Photos prises par le ROV Victor 6000 des différentes zones du HMMV lors de la campagne VICKING en 2006, (a) zone centrale, (b) zone couverte de tapis, et (c) zone des vers.

L'existence de microorganismes vivant profondément sous la surface de la terre est maintenant bien établie (Parkes *et al.*, 2000; D'Hondt *et al.*, 2002; Wellsbury *et al.*, 2002). Cette biosphère contient selon les auteurs entre 5 et 50 % de la biomasse terrestre totale (Parkes *et al.*, 1994; Whitman *et al.*, 1998). Dans ce biotope, les microorganismes se logent dans des pores, les fractures et des inclusions. Les effectifs microbiens sont importants dans les sédiments de surface (les 1^{er} mètres de sédiments contiennent entre $1,4$ et 4×10^9 cellules cm^{-3} dans la mer du Japon et la marge continentale Péruvienne respectivement par exemple) car la matière organique fraîchement déposée est facilement et rapidement dégradée. Ensuite, le nombre total de bactéries chute rapidement, suivant une décroissance logarithmique, dans les couches sous jacentes mais il subsiste encore $2,76 \times 10^6$ cellules cm^{-3} à la profondeur moyenne de 500 m sous le plancher océanique (Parkes *et al.*, 2000). Plusieurs facteurs physico-chimiques influencent la distribution des effectifs microbiens totaux dans les sédiments marins tels que les sources d'énergie, le carbone, la température, la pression, la salinité, l'âge et la porosité des sédiments.

Les sources d'énergie dans les écosystèmes profonds sont plutôt d'origines géochimiques. Les procaryotes à la fois autotrophes (assimilation du CO_2 comme seule source de carbone) et chimiolithotrophes (utilisation de composés inorganiques comme source d'énergie: H_2 , H_2S , Fe^{2+} par exemple) sont potentiellement capables de survivre et de croître dans les environnements souterrains, indépendamment de l'énergie lumineuse ou de composés organiques complexes. L'hydrogène serait une source d'énergie et d'électrons importante, au même titre que le CO_2 serait une source primordiale de carbone dans les écosystèmes profonds.

Les populations bactériennes de surface épuisent vraisemblablement toutes les sources d'énergie disponibles. Ainsi les sources de carbone et d'énergie pour les microorganismes de la biosphère profonde peuvent être générées par des processus abiotiques produisant des composés organiques complexes par exemple (Shock, 1997; Wellsbury *et al.*, 1997). Les interactions entre les processus bactériens et thermogéniques dans les sédiments marins pourraient donc expliquer l'existence d'une biosphère profonde cachée sur terre (Parkes *et al.*, 2000).

Les activités bactériennes sont plus élevées dans les sédiments de surface (jusqu'à 5 m de sédiment sous le plancher océanique) et décroissent rapidement avec la profondeur, à cause de la diminution concomitante des populations

bactériennes totales. Le type d'activités mesurées (sulfato-réduction, méthanogenèse, ou oxydation anaérobie du méthane) varie selon la profondeur. Cependant, la méthanogenèse est quantitativement plus importante que la sulfato-réduction dans les couches plus profondes. Et, une augmentation significative des populations anaérobies viables en fonction de la profondeur et de l'augmentation des concentrations en méthane a été observée. Il est possible que les populations de bactéries soient capables d'utiliser le méthane comme source d'énergie dans les couches les plus profondes.

Les résultats d'études phylogénétiques de la diversité microbienne dans la biosphère profonde suggèrent que les environnements souterrains ne sont pas des habitats statiques et hermétiques mais au contraire sujets à des échanges avec les sédiments de surface (Rochelle *et al.*, 1994; Marchesi *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2002; Cowen *et al.*, 2003; Kormas *et al.*, 2003).

Une connexion directe entre ces deux écosystèmes n'est pas exclue et pourrait expliquer les similitudes dans la composition et les activités des communautés microbiennes. Certains groupes phylogénétiques (ex: JS-1, SAGMEg, MCG ..) sont détectés uniquement dans les sédiments marins profonds et correspondent le plus souvent à des groupes d'incultivés c'est-à-dire sans représentants isolés en culture pure dans les collections internationales et pour lesquelles le rôle et fonction dans l'écosystème ne peuvent être inférés (voir paragraphe II-4).

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer la présence de vie à de telles profondeurs:

- migrations depuis la surface par des processus naturels géologiques (failles fractures, tectonique...),
- migration latérale ou verticale avec l'eau de surface *via* les infiltrations, les flux hydrodynamiques et les mouvements de fluides, ou
- capture dans les sédiments lors de leur formation.

Toutefois, l'origine des cellules dans les sédiments marins profonds demeure énigmatique.

II – LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DANS LES SEDIMENTS MARINS DES ZONES D'ÉMISSIONS DE FLUIDES FROIDS

II-1 – La méthanogenèse: étape finale de la dégradation anaérobie de la matière organique

La production biogénique de méthane ou méthanogenèse est un processus anaérobie important dans le cycle global du carbone (Liu et Whitman, 2008). La méthanogenèse est le moyen pour les *Archaea* méthanogènes d'obtenir de l'énergie pour leur croissance, qui sont les seuls organismes connus capables de produire du méthane (Thauer, 1998). Les méthanogènes sont des *Archaea* anaérobies stricts. Elles sont largement distribués dans la nature, mais sont confinés à des environnements anaérobies marins et terrestres. On les détecte dans des habitats tempérés, mais aussi à des températures, des salinités, et des pH acides (Liu et Whitman, 2008). La méthanogenèse a été détectée dans des environnements divers, tels que le rumen d'animaux, les stations d'épuration, et les sédiments de rizières, d'étangs, de rivière, de lacs ou marins (Ferry et Lessner, 2008). Environ 10 à 20% du matériel organique biodégradable enfoui dans les sols et les sédiments est converti en méthane. Pour les océans qui couvrent 70% de la surface de la terre, le taux annuel de méthanogenèse est estimé de 85 à 300 Tg (10^{12}) de CH_4 an^{-1} .

Dans les environnements anoxiques, la matière organique est décomposée en CH_4 et CO_2 par une chaîne de processus microbiens (Figure 12) incluant d'au moins trois groupes métaboliques bactériens (Ferry et Lessner, 2008).

Les polymères organiques sont initialement dégradés par des bactéries spécialisées hétérotrophes fermentatives, en sucres simples, lactate, acides gras volatiles et alcools (Liu et Whitman, 2008). Ensuite, les bactéries acétogènes décomposent les acides gras volatiles en acétate, H_2 , et formate qui sont des substrats pour la méthanogenèse. Les bactéries acétogènes sont un autre groupe de bactéries anaérobies qui peuvent réduire le CO_2 pour produire de l'énergie. Pendant la production d'acétate ou acétogenèse, le CO_2 est réduit en présence d' H_2 . D'autres substrats carbonés tels que les sucres, les alcools, les composés méthylés, et les acides organiques sont assimilés par les acétogènes pour fabriquer de l'acétate.

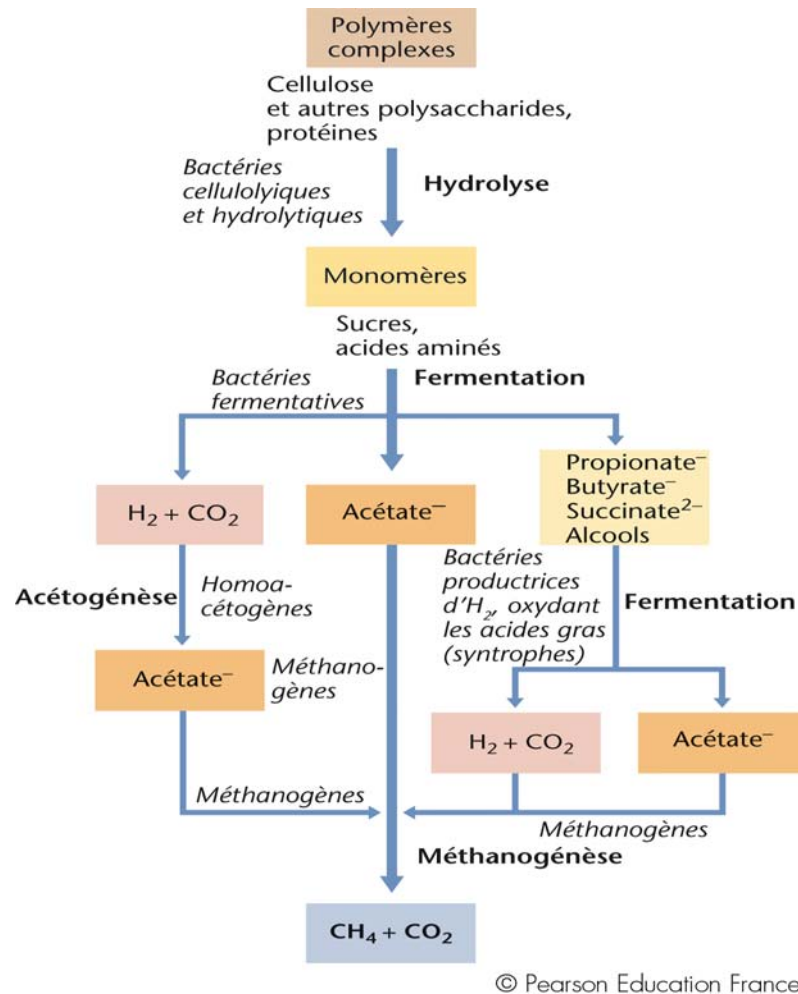


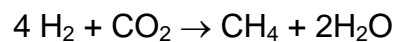
Figure 12: Dégradation anaérobie de la matière organique en méthane. D'après Brock (Madigan et Martinko, 2007)

Néanmoins, l'acétogénèse en présence d' H_2 est moins favorable d'un point de vue thermodynamique que la méthanogénèse. Les acétogènes ne concurrencent donc pas les méthanogènes lorsque les concentrations partielles en hydrogène restent optimales pour la méthanogénèse (Liu et Whitman, 2008). Les produits fermentés sont aussi dégradés par des bactéries syntrophiques en acétate, formate, H_2 , et CO_2 , qui sont des substrats pour la méthanogénèse. Les réactions catalysées par les bactéries syntrophiques, comme la conversion des acides gras volatiles ou des alcools en acétate, CO_2 , et H_2 , ne sont possibles qu'à des pressions partielles d' H_2 inférieures à 10^2 Pa. Quand les méthanogènes sont présents, l'hydrogène est rapidement métabolisé et maintenu à des concentrations inférieures à 10 Pa. Ainsi, les bactéries syntrophiques nécessitent d'être en association avec des méthanogènes ou d'autres organismes hydrogénotrophes pour la production d'énergie (Liu et Whitman, 2008).

II-1-1 - Les voies nutritionnelles de méthanogenèse

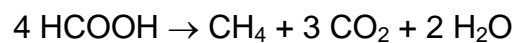
Les représentants cultivés de méthanogènes décrits dans les collections de cultures sont divisés en trois catégories nutritionnelles selon le type de substrats cataboliques utilisés pour synthétiser le méthane (Garcia *et al.*, 2000):

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



$$(\Delta G^{\circ} = -135,6 \text{ KJ/ mol CH}_4)$$

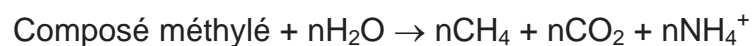
Le formate est également un substrat pour ce groupe nutritonnel:



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

La plupart des méthanogènes connus sont des hydrogénotrophes qui réduisent le CO₂ en méthane, en présence d'H₂ comme donneur d'électrons (Liu et Whitman, 2008). En effet, les études basées sur les isotopes stables de l'hydrogène et du carbone montrent que la méthanogenèse hydrogénotrophe est la voie prédominante dans les sédiments marins profonds (Liu et Whitman, 2008). Beaucoup d'espèces hydrogénotrophes sont capables d'utiliser le formate comme donneur majeur d'électrons à la place de l'H₂. Certaines espèces peuvent aussi utiliser des alcools secondaires, tels que le propanol, le butanol, ou le cyclopentanol comme donneurs d'électrons. Une faible portion des méthanogènes utilise aussi l'éthanol pour la synthèse de méthane.

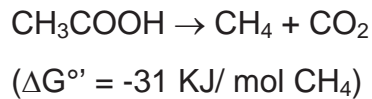
- Le deuxième groupe nutritionnel concerne les méthanogènes utilisant des substrats constitués par des groupements méthyles (-CH₃), et comprend le méthanol, les méthylamines (mono, di et triméthylamines) et les méthylsulfures, selon l'équation:



$$(-74,3 < \Delta G^{\circ} < -112,5 \text{ KJ/ mol CH}_4)$$

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

Enfin, le dernier groupe nutritionnel est basé sur l'utilisation de l'acétate pour synthétiser le méthane, selon l'équation:



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

Les méthanogènes ne peuvent donc utiliser qu'une gamme restreinte de substrats cataboliques (Liu et Whitman, 2008). Et la plupart des substrats organiques, tels que les hydrates de carbone, les acides gras à longue chaîne, et les alcools ne sont pas des substrats privilégiés pour les méthanogènes.

II-1-2 – La classification phylogénétique des méthanogènes

Sur la base de caractères phénotypiques et génotypiques, les méthanogènes se classent au sein de 5 ordres (Figure 13): les *Methanobacteriales*, les *Methanococcales*, les *Methanomicrobiales*, les *Methanosarcinales* et les *Methanopyrales* (Boone et Whitmann, 1988).

Les méthanogènes appartenant aux ordres des *Methanobacteriales*, des *Methanococcales*, des *Methanomicrobiales* et des *Methanopyrales* sont principalement des hydrogénotrophes (Garcia *et al.*, 2000). Les *Methanosarcinales* représentent le groupe nutritionnel le plus versatile. Cet ordre comprend deux familles: les *Methanosarcinaceae* et les *Methanosaetaceae*. Les *Methanosarcinaceae* comprennent le genre *Methanosarcina* dont les membres sont hydrogénotrophes, acétoclastes et méthylotrophes.

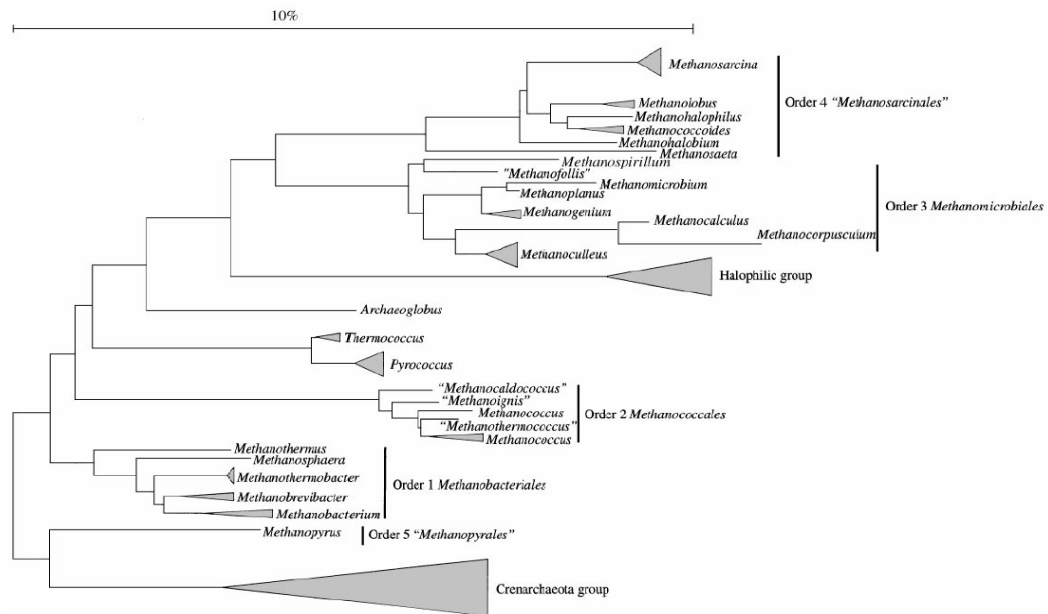


Figure 13: Arbre phylogénétique des méthanogènes. D'après Garcia *et al.* (2000).

Cependant, comme la réaction acétoclastique est la moins favorable en termes d'énergie libre ($\Delta G^{\circ} = -31 \text{ KJ/ mol CH}_4$), les méthanogènes du genre *Methanosarcina* utilisent préférentiellement les composés méthylés (Smith et Ingram-Smith, 2007). Les autres genres de cette famille sont des méthylotrophes obligatoires. Les *Methanosaetaceae* incluent le genre *Methanosaeta*, dont les membres sont des acétocastes obligatoires (Garcia *et al.*, 2000).

II-1-3 – La voie métabolique de méthanogénèse

La voie de méthanogénèse est complexe, et nécessite des coenzymes uniques et des complexes enzymatiques liés à la membrane. Le métabolisme énergétique des méthanogènes comprend deux parties (Figure 14). Dans la partie oxydative de la voie de méthanogénèse, les co-enzymes M (H-s-CoM) et le co-enzyme B (H-S-CoB) sont oxydés en hétérodisulfures CoM-S-S-CoB par le CO_2 , en acétate ou en composés en C_1 réduits ($\text{CH}_3\text{-X}$) comme le méthanol ou les méthylamines, qui sont à leur tour réduits en CH_4 . Dans la partie réductive, l'hétérodisulfure est réduit en co-enzyme M et en co-enzyme B, et le transport d'électrons est couplé à une phosphorylation (Thauer, 1998).

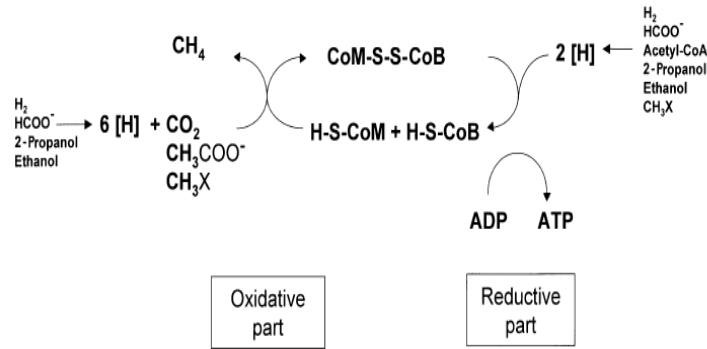


Figure 14: Métabolisme énergétique chez les méthanogènes (Thauer, 1998).

La voie de méthanogénèse comporte sept étapes (Figure 15).

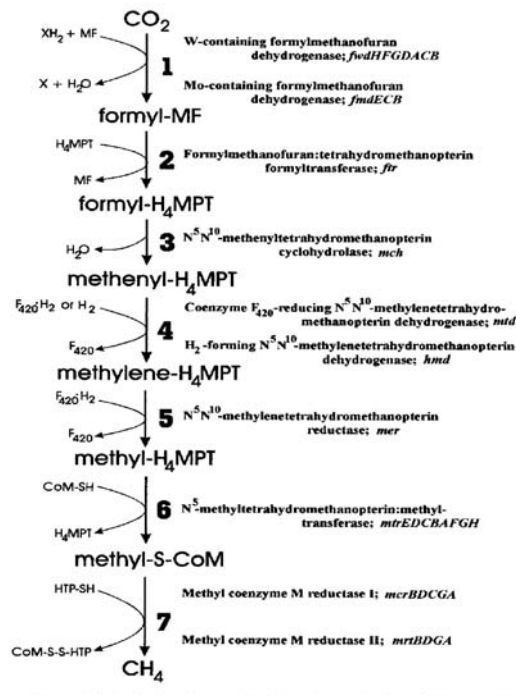


Figure 15: Voie de méthanogénèse basée sur la réduction de CO₂ dépendant du H₂ (Reeve *et al.*, 1997).

La dernière étape de la voie de méthanogénèse correspond à la réduction d'un groupement méthyl lié au CoM, et libère du méthane grâce à la présence d'une méthyl co-enzyme M réductase (MCR) qui libère le CH₄. La présence d'une MCR dans une cellule permet d'affirmer que celle-ci est une *Archaea* méthanogène. Ces MCR comprennent trois sous-unités α , β , et χ (Reeve *et al.*, 1997).

II-1-4 – Les gènes métaboliques chez les *Archaea* méthanogènes (et/ou méthanotrophes)

L'identification des méthanogènes, basée sur l'étude des gènes codant l'ARNr 16S comme marqueur phylogénétique, est limitée parce que les méthanogènes ne sont pas un groupe monophylétique (Friedrich, 2005). En effet, les séquences des gènes codant l'ARNr 16S indiquent que les méthanogènes ont divergé très tôt au sein du domaine *Archaea* (Reeve *et al.*, 1997). Les gènes codant pour des enzymes spécifiques de certaines voies métaboliques ont été proposés comme marqueurs fonctionnels des microorganismes. Il semble donc intéressant de détecter les méthanogènes en utilisant un gène marqueur fonctionnel spécifique.

La méthyl-coenzyme M réductase (MCR) catalysant la dernière étape de la méthanogenèse, est une enzyme clé du processus. Elle possède trois sous-unités codées par les gènes *mcrA*, *mcrB* et *mcrG*. Ces trois gènes sont situés dans l'opéron *mcrBDCGA*. L'enzyme MCR semble être unique et présente chez tous les méthanogènes (Thauer, 1998). En raison de contraintes fonctionnelles, la sous-unité catalytique α de la MCR, codée par le gène *mcrA*, possède des domaines très conservés, et détectés chez tous les méthanogènes. Ainsi, les gènes *mcrA* sont hautement conservés ce qui en fait de bons candidats comme marqueurs moléculaires pour des études en écologie microbienne. De plus, les arbres phylogénétiques construits à partir du gène *mcrA* pour les méthanogènes présentent des topologies comparables à celles des arbres construits à partir des gènes codant l'ARNr 16S (Figure 16) (Hales *et al.*, 1996; Luton *et al.*, 2002). Le gène *mcrA* qui code pour la MCR semble donc être un marqueur spécifique approprié pour l'identification phylogénétique des méthanogènes dans des échantillons environnementaux.

Les banques de clones des gènes codant l'ARNr 16S du domaine *Archaea* et/ou *mcrA* à partir d'échantillons de sédiments marins de zones d'émissions de fluides froids, mettent en évidence la présence de méthanogènes méthylophiles et hydrogénotrophes affiliés respectivement aux *Methanosarcinales* ou de *Methanomicrobiales* (utilisant le formate ou l' H_2), dans des zones de sédiment riches en sulfate (Inagaki *et al.*, 2004; Dhillon *et al.*, 2005).

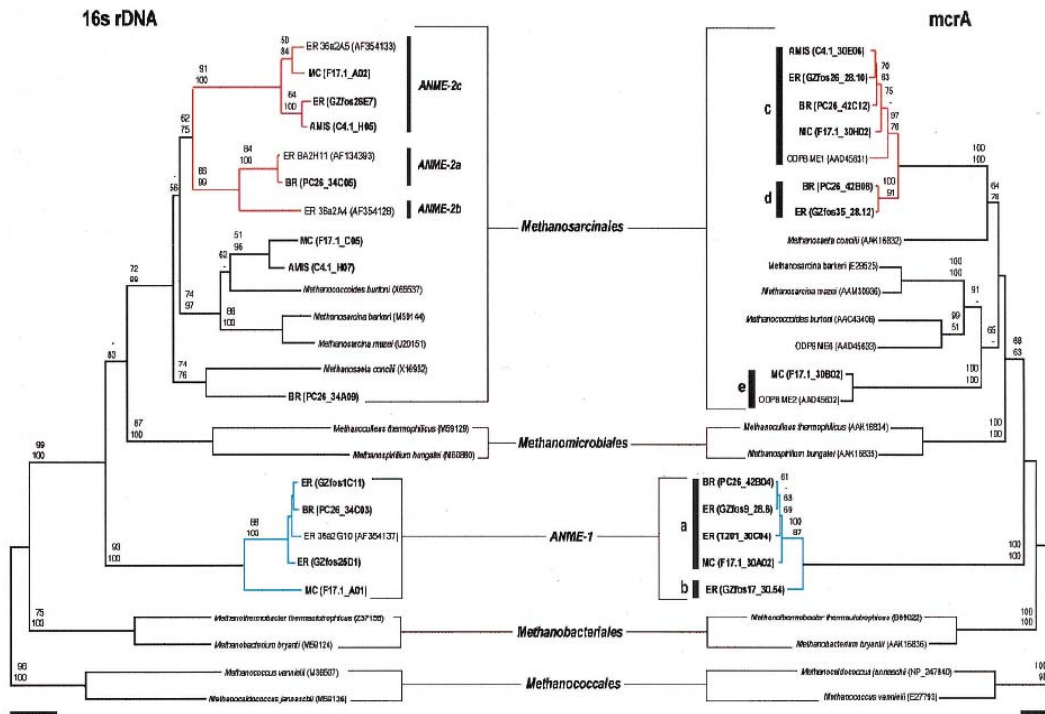


Figure 16: Comparaison d'arbres phylogénétiques de clones environnementaux et de méthanogènes, basé sur l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S et les gènes *mcrA*. D'après Hallam *et al.* (2003).

Dans des sédiments pauvres en sulfate, mais riches en méthane, les inventaires moléculaires sont dominés par des séquences affiliées aux *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* (Banning *et al.* 2005; Wilms *et al.*, 2006; Parkes *et al.* 2007; Smith *et al.*, 2008), et *Methanosaeta* (Parkes *et al.*, 2007).

II-1-5 – L'activité des méthanogènes

Les méthanogènes des sédiments marins ont des taux de croissance lents lorsqu'ils sont cultivés dans des milieux de culture spécifiques au laboratoire. Par exemple, le temps de doublement dans des conditions optimales de croissance est de 2,5 jours pour l'espèce *Methanogenium marinum* (Chong *et al.*, 2002) et de 3,5 jours pour l'espèce *Methanosarcina baltica* (von Klein *et al.*, 2002). En raison des contraintes de culture au laboratoire, ces microorganismes sont très difficiles à cultiver (Ritchie *et al.*, 1997). Seules huit espèces appartenant à cinq genres méthanogènes ont été isolées en culture pure à partir d'échantillons marins et sont disponibles dans les cultures de collections internationales (Tableau 1).

Nom de l'espèce type	Lieu d'isolement	Type métabolique	Référence
<i>Methanosarcina baltica</i>	Gotland Deep, mer Baltique	Méthylotrophe, hydrogénéotrophe et acétoclastique	von Klein <i>et al.</i> , 2002
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Scripps canyon, Californie	Méthylotrophe, hydrogénéotrophe et acétoclastique	Sowers <i>et al.</i> , 1984
<i>Methanobacterium aarhusense</i>	Aarhus bay, Danemark	Hydrogénéotrophe	Shlimon <i>et al.</i> , 2004
<i>Methanococoides alaskense</i>	Skan Bay, Alaska	Méthylotrophe	Singh <i>et al.</i> , 2005
<i>Methanogenium marinum</i>	Skan Bay, Alaska	Hydrogénéotrophe	Chong <i>et al.</i> , 2002
<i>Methanogenium boonei</i>	Skan Bay, Alaska	Hydrogénéotrophe	Kendall <i>et al.</i> , 2007
<i>Methanococoides methylutens</i>	Scripps canyon, Californie	Méthylotrophe	Sowers et Ferry, 1983
<i>Methanoculleus submarinus</i>	Nankai Trough, côte japonaise	Hydrogénéotrophe	Mikucki <i>et al.</i> , 2003

Tableau 1: Espèces de méthanogènes isolées de sédiments marins dans les cultures de collection internationale.

En utilisant différents substrats marqués radioactifs (^{14}C), les taux d'activité de méthanogenèse appartenant aux trois groupes nutritonnels, peuvent être mesurés précisément. Le tableau 2 récapitule de façon non-exhaustive les taux d'activités mesurés dans des sédiments de marges passives ou actives (Nankai Trough).

Site d'étude (référence)	Taux MG	Taux AOM	[CH ₄]
Gulf of Mexico (Orcutt <i>et al.</i> , 2005)	<u>Lac de saumure</u> bic < 0.4 nmol cm ⁻³ j ⁻¹ ac < 0.6 pmol cm ⁻³ j ⁻¹ <u>Hydrate de gaz</u> bic 30 nmol cm ⁻³ j ⁻¹ ac < 0.1 nmol cm ⁻³ j ⁻¹	<u>Lac de saumure</u> < 2 nmol cm ⁻³ j ⁻¹ <u>Hydrate de gaz</u> 160 nmol cm ⁻³ j ⁻¹	<u>Lac de saumure</u> < 30 µM <u>Hydrate de gaz</u> < 1.5 mM
Northern North Sea (Wegener <i>et al.</i> , 2008)	ND	<u>Gulfaks, sédiments recouverts de tapis</u> de 0.01 µmol cm ⁻³ à 0.18 µmol cm ⁻³ j ⁻¹	ND
Aarhus Bay (Thomsen <i>et al.</i> , 2001)	< 1.2 nmol cm ⁻³ j ⁻¹	< 0.79 nmol cm ⁻³ j ⁻¹	< 1.5 mM
Black Sea thick microbial mat (Treude <i>et al.</i> , 2007)	ND	7.8 à 20.9 µmol cm ⁻³ j ⁻¹	2.8 mM
Hydrate Ridge (Treude <i>et al.</i> , 2003)	ND	<u>Champs de <i>Beggiatoa</i></u> < 5.5 à 0.24 µmol cm ⁻³ j ⁻¹ <u>Champs à <i>Calyptogena</i></u> < 2.70 µmol cm ⁻³ j ⁻¹ <u>Champs à <i>Acharax</i></u> < 0.065 µmol cm ⁻³ j ⁻¹	ND
NDSF (Omorgie <i>et al.</i> , 2009)	ND	<u>Amon et Isis MV</u> < 300 nmol cm ⁻³ j ⁻¹	<u>Amon et Isis MV</u> < 2.5 mM
Brackish lake, Beaulieu estuary (Banning <i>et al.</i> , 2005)	bic < 20 nmol cm ⁻³ j ⁻¹ ac < 5 nmol cm ⁻³ j ⁻¹	ND	< 0.9 mM
Skagerrak, Denmark (Parkes <i>et al.</i> , 2007)	bic < 690 pmol cm ⁻³ j ⁻¹ ac < 167 pmol cm ⁻³ j ⁻¹	< 3.3 nmol cm ⁻³ j ⁻¹	< 25 mM
Nankai Trough (Newberry <i>et al.</i> , 2004)	bic < 102 pmol cm ⁻³ j ⁻¹ metOH < 35 pmol cm ⁻³ j ⁻¹ ac < 0.11 pmol cm ⁻³ j ⁻¹	ND	ND
Nankai Trough (Yoshioka <i>et al.</i> , 2009)	bic < 0.09 pmol cm ⁻³ j ⁻¹ ac < 0.75 pmol cm ⁻³ j ⁻¹	ND	ND

Tableau 2: Récapitulatif de taux d'activités de méthanogenèse (MG) à partir d'acétate (ac) ou de bicarbonate (bic) ou de méthanol (metOH), taux d'activités d'AOM, et des concentrations en méthane dans différentes zones d'émission de fluides froids, exprimés en moles de méthane par jour et par cm³ de sédiment. ND: non déterminé.

Les taux d'activité de méthanogenèse à partir de bicarbonate sont plus élevés que ceux mesurés à partir de l'acétate, à une exception près. Cette observation confirme l'hypothèse généralement répandue, qui stipule que la méthanogenèse hydrogénotrophe est la voie dominante dans les zones d'émissions de fluides froids.

Les effectifs cellulaires des *Archaea* méthanogènes parmi la population microbienne totale, calculés à l'aide de techniques de PCR en temps réel (QPCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction), ont mis en évidence que les méthanogènes représentent moins de 1 % des densités cellulaires totales dans des sédiments marins de Hydrate Ridge du Nord ouest Pacifique (Colwell *et al.*, 2008). Les populations méthanogènes représentent moins de 1000 cellules par gramme de sédiment. Cette observation pourrait expliquer pourquoi il est souvent difficile de détecter les méthanogènes dans les sédiments marins, que ce soit par l'utilisation de techniques moléculaires ou de cultures d'enrichissement.

D'autre part, dans des cultures en chemostat, la souche méthanogène *Methanoculleus submarinus* isolée de sédiments profonds de la fosse Nankai produit 0,017 fmoles de méthane par cellule et par jour. Les taux de méthanogenèse *in situ* dans des sédiments riches en hydrate (site Hydrate Ridge), ont été estimés en couplant le résultat des dénombrements cellulaires totaux de méthanogène et le taux d'activité de méthanogenèse à partir de la souche modèle *M. submarinus* (Colwell *et al.*, 2008). Cependant, il est utile de préciser que cette estimations de taux d'activité varie en fonction du nombre de cellules de méthanogènes et des paramètres environnementaux (pression *in situ*, température, concentration en substrat...).

II-2 – Le cycle du soufre et la réduction du sulfate (RS)

Le soufre (S) est un des éléments les plus abondants de la croûte terrestre. Globalement, le cycle du soufre est constitué par les transformations du soufre entre ses formes réduites et oxydées. Les procaryotes, c'est-à-dire *Archaea* et *Bacteria* jouent un rôle prépondérant dans le cycle du soufre, étant impliqués dans la réduction des sulfates, l'oxydation des sulfures et la transformation des composés soufrés partiellement oxydés (comme le sulfite, le thiosulfate et le soufre élémentaire). Dans les sédiments marins, la réduction du sulfate est l'un des processus respiratoires les plus importants d'un point de vue quantitatif (Omoregie *et*

al., 2008). La concentration élevée en sulfate dans l'eau de mer (~ 28mM) fait des sédiments marins un habitat privilégié pour les bactérie sulfato-réductrices. Du fait de la dominance des conditions oxygènes dans les océans, l'espèce soufrée majeure dans l'eau de mer est l'ion sulfate (SO_4^{2-}). La quantité de matière organique dans les sédiments anoxiques riches en sulfate, dépend des taux de réduction de l'oxygène, nitrate, manganèse et fer dans la couche suboxique.

Les processus appartenant au cycle du soufre sont résumés Figure 17, et sont principalement : réduction du sulfate en H_2S (assimilatrice et/ou dissimilatrice), oxydation microbienne ou chimique, précipitation chimique avec des ions métalliques, et disproportionation bactérienne (utilisation soufre élémentaire). Les sulfates sont également réduits par un processus abiotique (réduction thermochimique des sulfates) au cours duquel les sulfates sont réduits en H_2S à l'aide d'une catalyse thermique et non par des microorganismes (Bechte et Püttmann, 1991). Les composés soufrés partiellement oxydés, comme le soufre élémentaire, le sulfite et le thiosulfate jouent un rôle important comme intermédiaires dans le cycle du soufre. Ces composés peuvent être transformés par réduction, oxydation ou disproportionation. Ainsi les sulfates et/ou le sulfure d'hydrogène sont à nouveau disponibles.

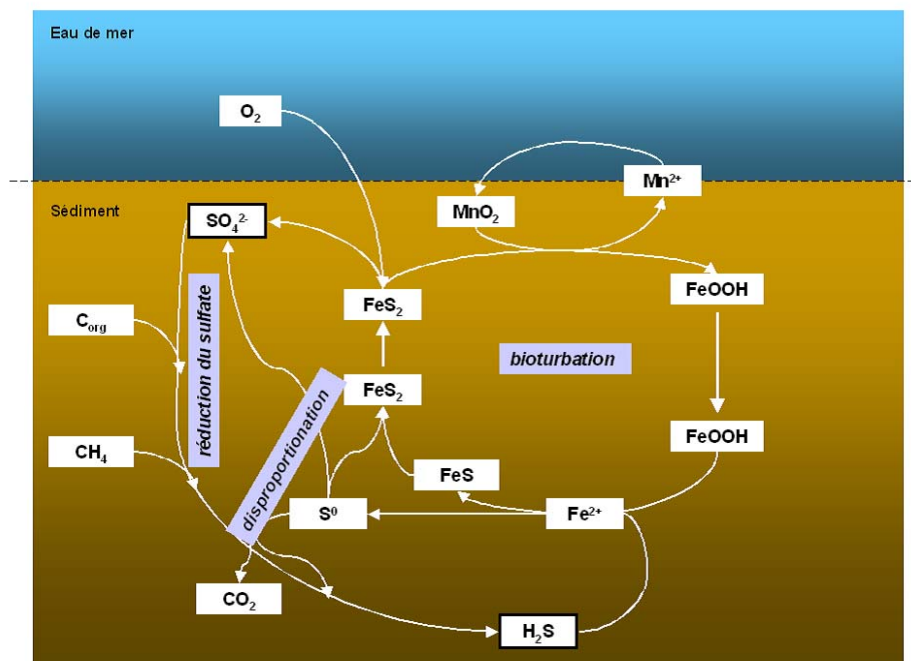


Figure 17: Le cycle du soufre dans les sédiments marins. D'après Jorgensen *et al.* (2004).

Les sulfures libres précipitent avec les ions métalliques pour former des sulfures métalliques insolubles. Le fer est le métal le plus commun dans la croûte terrestre. Ainsi dans les sédiments marins et lacustres, une partie de l' H_2S est précipité en monosulfure de fer (FeS), et en pyrite (FeS_2). La pyrite, la forme la plus stable des sulfures de fer d'un point de vue thermodynamique, peut être formée grâce à de nombreux mécanismes et peut être préservée à une échelle de temps géologique dans les sédiments anoxiques. La réoxydation des espèces soufrées en sulfate à la surface des sédiments peut se produire en présence d'oxygène, de nitrate, ou d'oxydes de manganèse. La bioturbation faunistique cause le déplacement des oxydes de fer vers la zone de production de sulfures, où ils réagissent avec l' H_2S . Ainsi, un recyclage efficace du soufre est possible.

II-2-1 – La classification des bactéries sulfato-réductrices (BSR)

Les BSR sont uniques parce qu'elles peuvent utiliser du sulfate inorganique (minéral) comme accepteur terminal d'électrons et produisent de grandes quantités d'hydrogène sulfuré (Drake et Akagi, 1978). Les BSR occupent de nombreux habitats terrestres et aquatiques anaérobies. Certaines sont chimiolithoautotrophes, et d'autres sont capables de réaliser l'oxydation complète ou partielle d'un grand nombre de substrats carbonés.

Les BSR forment un groupe phylogénétiquement divers et peuvent être classées en quatre grands groupes, affiliées à la fois aux *Bacteria* et aux *Archaea* (Castro *et al.*, 2000) :

- (i) les bactéries à Gram négatif mésophiles rassemblées dans les familles *Desulfovibrionaceae* et *Desulfobacteriaceae* (incluant une espèce thermophile *Desulfacinum infernum*),
- (ii) les bactéries à Gram positif sporulantes du genre *Desulfotomaculum*,
- (ii) les bactéries thermophiles à Gram négatif des genres *Thermodesulfovibrio* et *Thermodesulfobacterium*,
- (ii) les *Archaea* hyperthermophiles du genre *Archaeoglobus*.

Deux familles de BSR appartiennent aux δ -*Proteobacteria* : les *Desulfovibrionaceae* (avec les genres *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium*), et les *Desulfobacteriaceae*. La famille des *Desulfobacteriaceae* comprend entre autres les

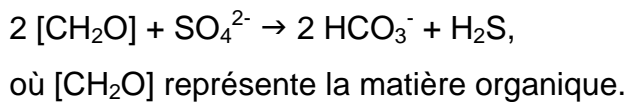
genres *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, et *Desulfosarcina*. Une définition précise de ce groupe sur la base des analyses phylogénétiques est difficile (Castro *et al.*, 2000). Le genre *Desulfobulbus*, par exemple, est un groupe profondément raciné dans l'arbre phylogénétique des BSR, et pourrait même représenter une famille séparée.

II-2-2 – La réduction des sulfates

Deux types de réduction du sulfate existent :

- (i) une réduction assimilatrice, qui sert de voie de biosynthèse pour les molécules organiques qui contiennent du soufre, et
- (ii) une réduction dissimilatrice, par laquelle les microorganismes conservent l'énergie et libèrent de l' H_2S dans l'environnement. Seule la réduction dissimilatrice joue un rôle dans la minéralisation de la matière organique, à l'origine de l' H_2S dans les sédiments.

La réduction dissimilatrice des sulfates peut être décrite par l'équation:



La réduction dissimilatrice des sulfates est un processus respiratoire anaérobie rencontré chez les procaryotes. Les sulfates servent d'accepteur final d'électrons lors de l'oxydation de l'hydrogène (H_2) ou de la matière organique.

La réduction dissimilatrice des sulfates (Figure 18) est divisée en deux étapes: la réduction du sulfate en (bi)sulfite HSO_3^- , et la réduction du (bi)sulfite en sulfure (Drake et Akagi, 1978). Cette deuxième étape implique des intermédiaires réactionnels Figure 19, et est catalysée par la (bi)sulfite réductase dissimilatrice (DSR).

Comme la réduction assimilatrice des sulfates produit des molécules organiques, il n'y a pas de production de sulfure d'hydrogène libre. Cependant, au cours de la minéralisation anaérobie de biomasse détritique, de l' H_2S peut être libéré, liant ainsi la réduction assimilatrice des sulfates à la formation des sulfures libres.

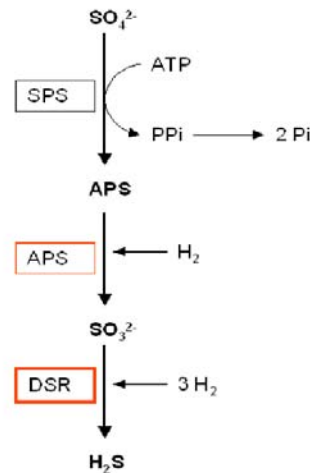


Figure 18: Voie de réduction du sulfate en sulfure d'hydrogène. SPS, ATP sulfurylase, APS, adénylylsulfate réductase, DSR, sulfite réductase. D'après Schönheit *et al.* (1995).

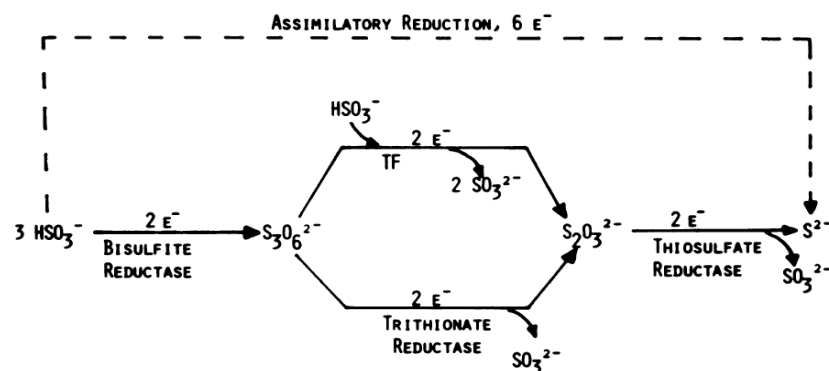
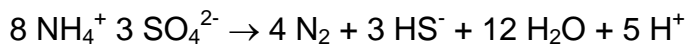


Figure 19: Voies biochimiques assimilatrice et dissimilatrice de réduction du (bi)sulfite (HSO_3^-) en sulfure (S^{2-}). D'après Drake *et al.* (1978).

D'autre part, il a été démontré récemment que le couplage entre la réduction des sulfates et l'oxydation de l'ammonium était possible d'un point de vue thermodynamique (Schrum *et al.*, 2009), selon l'équation :



II-2-3 – Les habitats et l'activité des BSR

Les sédiments marins sont un habitat privilégié pour les BSR. Les facteurs primordiaux de la réduction des sulfates dans les sédiments sont la température et la disponibilité en matière organique dégradable. Dans les sédiments riches en matière

organique, le taux d'activité de réduction des sulfates atteint $5000 \text{ nmol SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3} \text{ jour}^{-1}$, mais des valeurs comprises entre 10 et $1000 \text{ nmol SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3} \text{ jour}^{-1}$ sont généralement mesurées dans les sédiments côtiers (Skyring, 1987). En eau douce, les taux de réduction des sulfates sont en général 100 fois plus faibles qu'en milieu marin (Elsgaard *et al.*, 1994).

Les sulfates pénètrent une couche de quelques décimètres à quelques mètres dans les sédiments marins, alors qu'en eau douce seuls les premiers centimètres contiennent des sulfates (Bak et Pfennig, 1991). Bien que les sédiments marins et lacustres représentent les habitats les plus répandus pour les BSR, les plus forts taux de réduction des sulfates ont été mesurés dans les tapis microbiens de cyanobactéries atteignant des valeurs de 5 à $10 \text{ mmol SO}_4^{2-} \text{ cm}^{-3} \text{ jour}^{-1}$ (Jorgensen, 1994). Ces tapis microbiens sont fréquemment rencontrés dans les environnements hypersalins et/ou chauds.

Les BSR peuvent être séparées en deux groupes nutritionnels: celui des BSR qui oxydent complètement leur substrat en CO_2 et celui des BSR qui oxydent incomplètement leur substrat en acétate.

Les représentants cultivés appartenant à la famille *Desulfobacteraceae* peuvent vivre à différentes concentrations de sulfate, ou de donneurs d'électrons (Leloup *et al.*, 2007). La plupart peuvent oxyder une large gamme de donneurs d'électrons (H_2 , fumarate, malate, benzoate, acides gras, alcools, acétate, propionate, butyrate, et composés aromatiques) complètement en CO_2 , faisant d'eux des colonisateurs adaptés aux environnements marins anoxiques.

Les membres du genre *Desulfobulbus* sont souvent détectés dans des systèmes de traitements des égouts et des eaux usées (Bahr *et al.*, 2005). Les représentants des *Desulfobulbus* oxydent de façon incomplète une large gamme de substrats (propionate, propanol, lactate et éthanol) et sont capables d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons que le sulfate, leur donnant ainsi un avantage compétitif.

Les BSR appartenant au genre *Desulfovibrio* peuvent co-exister avec des *Archaea* méthanogènes pour réduire la matière organique dans les eaux douces caractérisés par de faibles concentrations en sulfate (Leloup *et al.*, 2007). Les BSR du genre *Desulfovibrio* peuvent réduire des formes solubles oxydées d'uranium en formes insolubles, car elles possèdent la capacité d'extraire de vastes quantités de métaux de leurs milieux de culture (Chang *et al.*, 2001). Les BSR de ce genre

présentent une tolérance et une adaptation vis à vis des métaux lourds. Les BSR des genres *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium* sont fréquemment trouvés dans des biofilms de systèmes d'épuration d'égouts (Cook *et al.*, 2008). En cultures pures, ces BSR oxydent les produits de fermentation (lactate, propionate, acides gras et alcools) de façon incomplète. Ces bactéries ont la capacité d'utiliser des accepteurs d'électrons alternatifs autre que le sulfate, ce qui leur donne un avantage sélectif.

D'autre part, il a récemment été démontré que certaines BSR peuvent survivre, voir se développer en milieu oxygéné. De plus sous certaines conditions, l'oxygène peut être utilisé comme accepteur d'électrons. Ainsi, *Desulfovibrio gigas* est capable de respirer ses réserves de carbone en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons (Santos *et al.*, 1993). L'énergie générée par ce procédé permettrait au microorganisme de survivre pendant une longue période dans des environnements oxygénés.

Le genre *Desulfotomaculum* appartient au groupe des Gram positifs formant des spores. Les espèces appartenant au genre *Desulfotomaculum* ont la capacité de survivre dans des environnements avec des faibles taux de matière organique, grâce à leur capacité à sporuler (Leloup *et al.*, 2006), et dégradent une grande variété de substrats (lactate, acétate, acides gras, propionate, butyrate et éthanol) (Dhillon *et al.*, 2003). L'hydrogène sert de donneur d'électrons pour la plupart des espèces, et certaines BSR sont autotrophes (Bahr *et al.*, 2005). Certaines espèces peuvent oxyder des totalement des substrats méthylés en CO₂.

II-2-4 – Les gènes métaboliques et les microorganismes sulfato-réducteurs

Comme pour les méthanogènes, d'autre marqueurs alternatifs aux gènes codant l'ARNr 16S ont d'ores et déjà été utilisés avec succès pour étudier la phylogénie des bactéries sulfato-réductrices. Ainsi le gène codant pour une enzyme clé de la voie de réduction du sulfate a été proposée comme marqueur fonctionnel des BSR. L'enzyme la plus souvent ciblée comme marqueur fonctionnel est la réductase dissimilatrice du (bi)sulfite, qui catalyse la réduction du sulfite en sulfure d'hydrogène (dissimilatory sulfite reductase, DSR). En effet, cette enzyme est détectée chez toutes les BSR étudiées jusqu'ici et chez quelques organismes ne réduisant pas le sulfate mais respirant le sulfite (Klein *et al.*, 2001). L'enzyme DSR est composée d'au moins deux polypeptides structurés en α_2 et β_2 . Les gènes

codants pour ces deux sous-unités sont *dsrA* et *dsrB* (appelés *dsrAB*), qui sont adjacents dans le génome des BSR, et possèdent un haut degré de conservation. Les topologies des arbres phylogénétiques basés sur les gènes codant l'ARNr 16S et *dsrAB* sont congruentes (Figure 20) (Zverlov *et al.*, 2005), malgré quelques discordances expliquées par des transferts génétiques horizontaux (Klein *et al.*, 2001). De plus, la grande diversité phylogénétique des BSR rend leur étude délicate par l'approche de l'analyse du gène ARNr 16S.

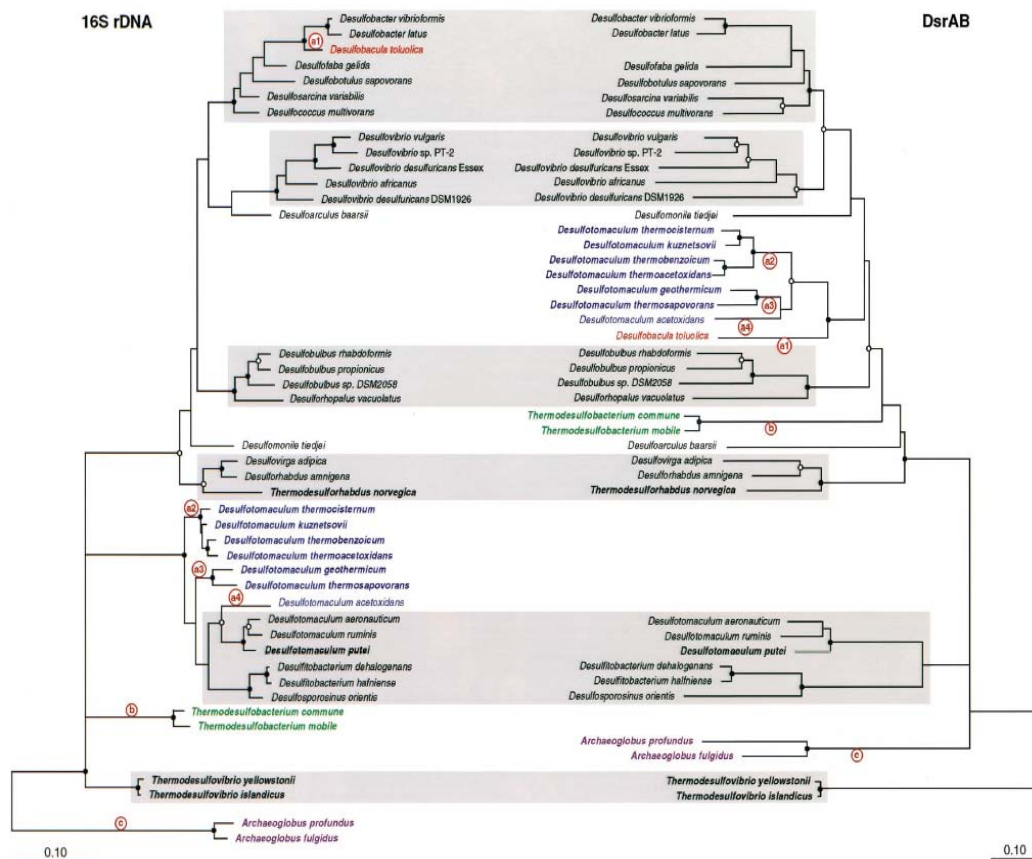


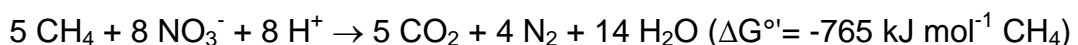
Figure 20: Comparaison des topologies des arbres phylogénétiques basés sur l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S et *dsrAB*. D'après Klein *et al.* (2001).

Donc, l'étude de la diversité des BSR basée sur l'analyse du gène fonctionnel *dsrAB* constitue une bonne alternative séduisante par rapport à l'étude des gènes codant l'ARNr 16S (Leloup *et al.*, 2007).

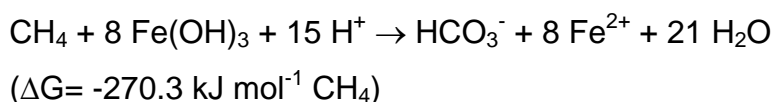
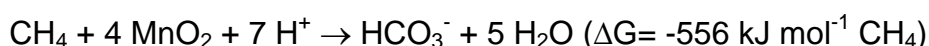
II-3 – L'oxydation anaérobie du méthane (AOM)

L'AOM représente un biofiltre majeur capable d'éliminer le gaz à effet de serre méthane, dans les sédiments marins (Knittel *et al.*, 2005). Plus de 90% du méthane produit est consommé par l'AOM, ce qui représente 7 à 25% de la production totale de méthane. Ainsi, l'AOM contrôle efficacement les flux de méthane vers l'hydrosphère puis l'atmosphère (<2% des flux globaux). Les études relatives aux microorganismes responsables de l'AOM sont limitées. En effet, jusqu'ici les *Archaea* méthanotrophes anaérobies ou ANME (ANAerobic METHanotroph) probablement impliquées dans le processus d'AOM n'ont pas pu être isolées en cultures pures. La plupart des travaux portant sur l'AOM sont menés dans des eaux ou sédiments marins anoxiques, et plus précisément dans les couches sédimentaires où les concentrations en méthane et en sulfate sont proches de zéro, c'est à dire dans la ZTMS (paragraphe II-2-1). Dans ces sédiments, l'AOM est le plus souvent couplée au processus de réduction du sulfate. Cependant d'autres accepteurs d'électrons plus favorables d'un point de vue thermodynamique pourraient (NO_3^- , Fe^{3+} , ou Mn^{4+}) participer au processus d'AOM.

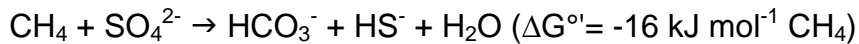
Ainsi, Raghoebarsing *et al.* (2006) ont montré à l'aide de cultures d'enrichissements de sédiments d'un canal anoxique riche en nitrates, l'existence d'un consortium de microorganismes capables d'effectuer l'AOM couplée à la dénitrification, selon l'équation :



Certains métaux tels que le fer et le manganèse sont utilisés comme accepteurs d'électrons couplés à l'AOM, dans des enrichissement de sédiments du bassin d'Eel River (Beal *et al.*, 2009). Ces réactions pourraient se produire selon l'équation:



Enfin, le mécanisme le plus répandu est celui de l'AOM couplée au sulfate, qui se produit selon l'équation :



En effet, des études basées sur la technique de FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) couplées à des mesures d'activités d'AOM et de SR, ont révélé que ces groupes d'ANME sont associés avec des partenaires SRB spécifiques (Figure 21), sous forme de consortia structurés (Boetius *et al.*, 2000).

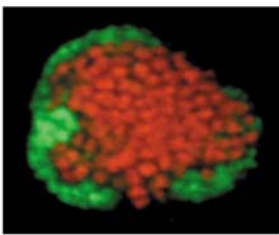


Figure 21: Identification *in situ* d'un agrégat ANME/SRB basé sur la technique de FISH, utilisant des sondes spécifiques marquées. En rouge sont marqués les ANME, et en vert sont marqués les SRB. D'après Boetius *et al.* (2000).

II-3-1 – La diversité phylogénétique des ANME

La détection et l'identification des ANME s'opère à l'aide de techniques de biologie moléculaire (détection de biomarqueurs lipidiques non enrichis en ^{13}C , et séquences des gènes codant l'ARNr 16S) et de mesures d'activité d'AOM (Treude *et al.*, 2007). Jusqu'à aujourd'hui trois clades phylogénétiques distincts d'ANME ont été clairement identifiés: ANME-1, 2 et 3 (Figure 22).

Les membres du group ANME-1 sont affiliés aux *Methanosarcinales* et *Methanomicrobiales* et se trouvent le plus souvent sous forme de cellules libres (Orphan *et al.*, 2001; Knittel *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2005). Les ANME-1 sont également détectés sous forme d'agrégats cellulaires (Orphan *et al.*, 2002; Orcutt *et al.*, 2005) associées à des BSR notamment dans des sédiments propices au développement de tapis microbiens.

Les représentants du groupe ANME-2 sont affiliés à l'ordre des *Methanosarcinales*, et sont le plus souvent associés physiquement avec des BSR appartenant au genres *Desulfosarcina* et *Desulfococcus*. Ces associations syntrophiques forment des consortia structurés (Boetius *et al.*, 2000; Knittel *et al.*, 2005). Les lignées phylogénétiques d'ANME-2 se divisent en trois sous-groupes a, b

et c. La grande diversité infra spécifique des ANME-2 implique certainement des différences physiologiques parmi les membres de ces différents sous-groupes d'ANME-2 (Teske *et al.*, 2002).

Enfin, les membres du clade ANME-3 sont affiliés aux genres méthanogènes *Methanococcoides* ou *Methanolobus*, et sont associés avec des BSR appartenant au genre *Desulfobulbus* (Niemann *et al.*, 2006).



Figure 22: Arbre phylogénétique des ANME, basé sur les gènes codant l'ARNr 16S. D'après Lösekann *et al.* (2007).

Les gènes *mcrA* ont été identifiés dans des enrichissements d'ANME-1 et 2, et la protéine MCR a été isolée d'un tapis microbien où l'AOM se produit. Ainsi, le gène *mcrA* apparaît comme un marqueur spécifique facilitant l'identification phylogénétique des ANME et les méthanogènes dans un environnement complexe (Hallam *et al.*, 2003, 2004). Sur cette base, Hallam *et al.* ont définis des groupes *mcrA* a/b, c/d, et e. En construisant des arbres phylogénétiques basés sur les gènes ARNr 16S et un autre basé sur le gène *mcrA*, ils ont conclu que le groupe *mcrA* a/b pouvait être assimilé aux ANME-1, et que les groupes *mcrA* c/d aux ANME-2c et *mcrA* e aux ANME-2a (Figure 16). Récemment, Lösekann *et al.* (2007) ont associé le groupe *mcrA* f aux ANME-3.

II-3-2 – L'activité et la physiologie des consortia AOM

Les mécanismes de l'AOM sont encore largement inconnus. La niche écologique privilégiée pour le développement des ANME est la zone de transition sulfate-méthane (ZTMS, paragraphe II-2-1) dans les systèmes aquatiques anoxiques. Le méthane est totalement oxydé dans la ZTMS qui se trouve entre quelques centimètres à quelques dizaines de mètres sous l'interface sédiment-eau de mer. La STMS se situe en fonction du taux de sédimentation de la matière organique dégradable, la profondeur de la zone de production du méthane, des flux de méthane et de sulfate et des activités d'AOM et de SR respectifs. Les forts taux d'activité d'AOM et de SR sont mesurés directement dans la ZTMS (Tableau 3). Les taux d'AOM mesurés dans des échantillons provenant de différents écosystèmes aquatiques aux température *in situ* (mais à pression atmosphérique) sont résumés dans le tableau 3. Les taux d'activité sont généralement plus élevés *in situ* en raison des pression partielles en méthane plus importantes à ces profondeurs. L'utilisation d'incubateurs *in situ* montrent une variation des activités d'AOM qui peut atteindre $\pm 50\%$ (Antje Boetius, communications personnelles).

Habitat	Taux d'AOM ($\text{nmol cm}^{-3} \text{ jour}^{-1}$)
Récifs microbiens de la Mer Noire	1,000-10,000
Hydrates de gaz	100-5000
Volcans de boue	10-1500
ZTMS dans des sédiments côtiers	1-50
ZTMS dans des marges continentales	0.1-10
ZTMS de subsurface	0.001-1
Colonne d'eau anoxique	0.0001-0.01
Eau de lacs	0.0001-1
Sédiments de lacs	0.0001-1

Tableau 3: Taux d'activités d'AOM mesurés dans différents habitats aquatiques. D'après Knittel *et al.* (2009). AOM: Anaerobic oxidation of methane; ZTMS, sulfate-methane transition zone.

L'association des ANME avec des partenaires bactériens sulfato-réducteurs est souvent considérée comme une interaction syntrophique dans laquelle les *Archaea* méthanotrophes métabolisent le méthane. Cette première étape conduit à la production d'un intermédiaire réactionnel qui jouerait alors le rôle de donneur d'électron pour les BSR.

Hoehler *et al.* (1994) ont formulé l'hypothèse selon laquelle le méthane dans les ZTMS est probablement oxydé en CO₂, via une réaction biochimique de méthanogenèse inverse. Dans ces conditions, cette réaction utilise l'eau comme accepteur d'électrons et produit de l'H₂ qui est à son tour consommé par les BSR. Le processus d'AOM serait possible en présence de concentrations *ad hoc* de sulfate et méthane, et de pressions partielles en H₂ basses.

Par la suite L'équipe de Widdel (2001) a argumenté en faveur d'un processus de méthanogenèse inverse, impliquant le sulfate comme accepteur d'électrons. La haute énergie d'activation de la liaison C-H rend la dernière étape de la méthanogenèse irréversible. Il faut donc qu'une autre étape soit présente pour activer le méthane et initier le processus d'oxydation du méthane.

D'autre part l'approche biochimique développée par l'équipe de Krüger *et al.* (2003) a permis d'extraire, de purifier et d'identifier une protéine contenant du nickel, et dont le spectre d'absorption est similaire à un co-facteur F₄₃₀ de la méthyl co-enzyme M réductase (MCR) présente spécifiquement chez les méthanogènes. Une autre protéine a été purifiée lors de la même étude, et pourrait être la protéine qui initie la méthanogenèse inverse.

Une autre approche de génomique environnementale soutient également la théorie du mécanisme de méthanogenèse inverse. Ainsi, l'analyse de banques de fosmides à partir de cultures d'enrichissement d'ANME par Hallam et collaborateurs (2003) montrent que les représentants ANME possèdent dans leur génome tous les gènes nécessaires à la voie biochimique de méthanogenèse. Toutefois, aucune preuve directe ne permet de montrer si les ANME produisent du méthane pour générer de l'énergie *in situ*, en inversant leur voie enzymatique en réponse à des changements environnementaux.

Dans des tapis microbiens de la Mer Noire, il a été montré que l'AOM et la méthanogenèse se produisaient simultanément (Seifert *et al.*, 2006) Les travaux de Orcutt *et al.* (2005) proposent que des microorganismes phylogénétiquement proches mais physiologiquement différents seraient capables d'emprunter la méthanogenèse ou la méthanotrophie, en fonction des conditions environnementales. Les résultats de l'équipe de Parkes *et al.* (2007) montrent un couplage entre l'AOM et la méthanogenèse dans des sédiments de Skagerrak, au Danemark, suggérant que différentes populations de microorganismes seraient impliquées soit dans AOM soit dans la méthanogenèse.

D'autres études basées sur des cultures de méthanogènes, suggèrent que le processus d'AOM pourrait emprunter une voie métabolique différente de la méthanogenèse inverse. Ainsi, le modèle hypothétique de Valentine et *al.* (2000) repose sur la production d' H_2 et d'acide acétique à partir de deux molécules de méthane par les populations d'*Archaea* ANME. Les produits réactionnels seraient ensuite consommés par les BSR. Le gain d'énergie pour les deux membres du consortium serait alors deux fois plus important que la méthanogenèse inverse. En 2002, Nauhaus et ses collègues ont vérifié si l'ajout de composés chimiques pouvaient stimuler la réduction du sulfate en présence de méthane dans des incubations de sédiments soumis à des migrations de fluides froids. Les auteurs ont conclu que l' H_2 , l'acétate, le formate, le méthanol, le CO et les méthylamines ne pouvaient soutenir une activité de sulfato-réduction couplée à l'AOM et n'étaient donc pas des substrats intermédiaires potentiels pour l'AOM.

En 2008, un second modèle relatif au 'transfert de substrats' dans le processus d'AOM propose une production d'acétate par les ANME, à partir de CO_2 et CH_4 (méthanogenèse acétoclastique inverse), suivie par une consommation de l'acétate par les BSR. Récemment, Moran *et al.* (2008) ont proposé un modèle, appelé "méthylogénèse", dans lequel les "sulfures de méthyle" (méthanethiol et diméthylsulfide, produits de la décomposition de la matière organique) produits par des *Archaea* à partir de l'oxydation du méthane et de la réduction du CO_2 , seraient transférés aux BSR. Dans l'eau de mer, le méthanethiol est le produit principal de la décomposition du métabolite diméthylsulfoniopropionate des algues. Les bactéries peuvent convertir le méthanethiol en diméthylsulfide (DMS). Le DMS et le méthanethiol peuvent tous deux être utilisés comme substrats pour la méthanogenèse. Les produits de réduction du sulfate, HCO_3^- et HS^- , seraient utilisés dans les étapes initiales de méthanotrophie anaérobie, qui à leur tour produisent des "sulfures de méthyle" comme substrat pour la réduction de sulfate. Ce modèle permettrait d'expliquer:

- la faible diversité de partenaires BSR dans les consortia ANME/BSR,
- le nombre limité de BSR connus capables utiliser les "sulfures de méthyle", et
- l'impossibilité de détecter les autres intermédiaires réactionnels potentiels proposés (ex: H_2 et acétate).

II-3-3 – La distribution et les habitats des ANME

Les différents groupes d'ANME se distribuent dans plus de 50 différents écosystèmes marins d'émission de fluides froids, de sorties de fluides hydrothermaux chauds, les SMTZ, la biosphère profonde ainsi que dans la colonne d'eau et les écosystèmes terrestres. Ces habitats varient par exemple en termes de température, flux de méthane, salinité et pH. Ces études indiquent que les représentants des groupes ANME-1 et 2 sont présents dans tous les habitats explorés alors que les membres du groupe ANME-3 semblent exclusivement inféodés aux volcans de boue sous-marins. Les ANME-2a sont présents dans les sédiments associés aux tapis microbiens d'Hydrate Ridge alors que les ANME-2c colonisent les sédiments associés aux champs de *Calyptogenia* d'Hydrate Ridge. Les ANME-1 sont observés dans les sédiments sous-jacents aux tapis microbiens de la Mer Noire (Knittel *et al.*, 2005), et les ANME-1 du sous-groupe b sont détectés dans des zones d'émission de gaz de la Mer du Nord (Niemann *et al.*, 2005). La présence de phylotypes d'ANME diversifiés rend difficile l'étude des facteurs responsables de la distribution des *Archaea* méthanotrophes (Lloyd *et al.*, 2006). Les ANME-1 et 2 ont souvent été identifiées dans les mêmes habitats anoxiques, à des abondances différentes (Orphan *et al.*, 2001; Knittel *et al.*, 2005). De plus, les morphologies des consortia composés de SRB et ANME-1 diffèrent des morphologies des consortia de SRB associées avec des ANME-2 (Orphan *et al.*, 2002; Knittel *et al.*, 2005). La distribution des populations d'*Archaea* appartenant aux ANME-1 ou 2 suggère que les ANME privilégient des niches écologiques spécifiques. Pourtant, aucune relation entre la distribution des groupes d'ANME et les paramètres environnementaux n'a été démontrée (Nunoura *et al.*, 2006).

Nahaus *et al.* (2005) ont étudié les réponses de l'AOM aux changements de certains paramètres environnementaux, et leur impact sur la sélection des communautés d'ANME. Leurs résultats suggèrent que les ANME-2 seraient plus actifs que les ANME-1 à basses températures. D'autre part, Girguis *et al.* (2005) ont montré, que le débit de fluides (eau interstitielle) a une influence significative sur la dynamique de croissance des ANME-1 par rapport aux ANME-2. Ainsi, pour des régimes de flux intenses (environ 90 cm an⁻¹), les ANME-1 semblent être plus compétitifs que les ANME-2. Enfin, Knittel *et al.* (2005) ont suggéré que les ANME-1 seraient plus sensibles à l'oxygène que les ANME-2.

II-4 – La diversité des lignée d'*Archaea* incultivées dans les sédiments marins

Des trois domaines de la vie, celui des *Archaea* reste le plus énigmatique. Les *Archaea* ont été détectés dans beaucoup d'environnements, mais ils continuent à être considérés comme des microorganismes extrêmes, dominant les habitats représentant les limites de la vie, tels que les sources géothermales chaudes ou acides, les cheminées hydrothermaux, les lacs hypersalés, et les écosystèmes anoxiques (Schleper *et al.*, 2005). Beaucoup de groupes *Archaea* semblent être confinés à des régions géographiques spécifiques, ou à des écosystèmes partageant une géochimie comparable. Mais d'autres groupes semblent être largement distribués sur la planète. La distribution des communautés *Archaea* implique qu'ils contribuent aux cycles énergétiques globaux. Malgré cela, la majorité d'entre eux n'ont pas encore été isolés en cultures pures (Figure 23). Leurs rôles et leurs métabolismes demeurent donc spéculatifs. Nous proposons ici de décrire de manière non exhaustive certains groupes d'*Archaea* incultivés.

Le "Rice Cluster V" (RC-V) : à l'origine, les représentants non cultivés du RC-V ont été identifiés dans des sols anoxiques de rizières (Grosskopf *et al.*, 1998). Les niveaux infra spécifiques de similarité des gènes codant l'ARNr 16S sont très bas, indiquant que ce groupe est phylogénétiquement très diversifié. Les membres du RC-V pourraient avoir des activités métaboliques et des physiologies diverses. Les RC-V ont été observés dans des environnements tels que des rivières et des lacs. Les RC-V dominent dans les banques de gènes obtenus à partir d'échantillons d'eaux côtières riches en particules suspendues de la rivière Mackenzie au Canada, dont la température est inférieure à 0°C (Galand *et al.*, 2006). Les auteurs ont suggéré que les RC-V étaient impliqués dans les processus de décomposition de la matière organique. Les RC-V sont présents dans les couches oxiques et anoxiques de lacs méromictiques (c'est à dire dont les eaux de surface et de profondeur se mélangent moins d'une fois par an et pour certains moins d'une fois par décennie ou siècle) de la côte nord du Canada (Pouliot *et al.*, 2009). Les inventaires moléculaires montrent des séquences phylogénétiquement différents, suggérant que les RC-V des couches anoxiques semblent être plutôt adaptés à des eaux salées anoxiques. Les RC-V ont également été détectés dans les sédiments anoxiques, froids (7.5°C) du Lac Dagow, dominés par le processus de méthanogenèse (Glissman *et al.*, 2004).

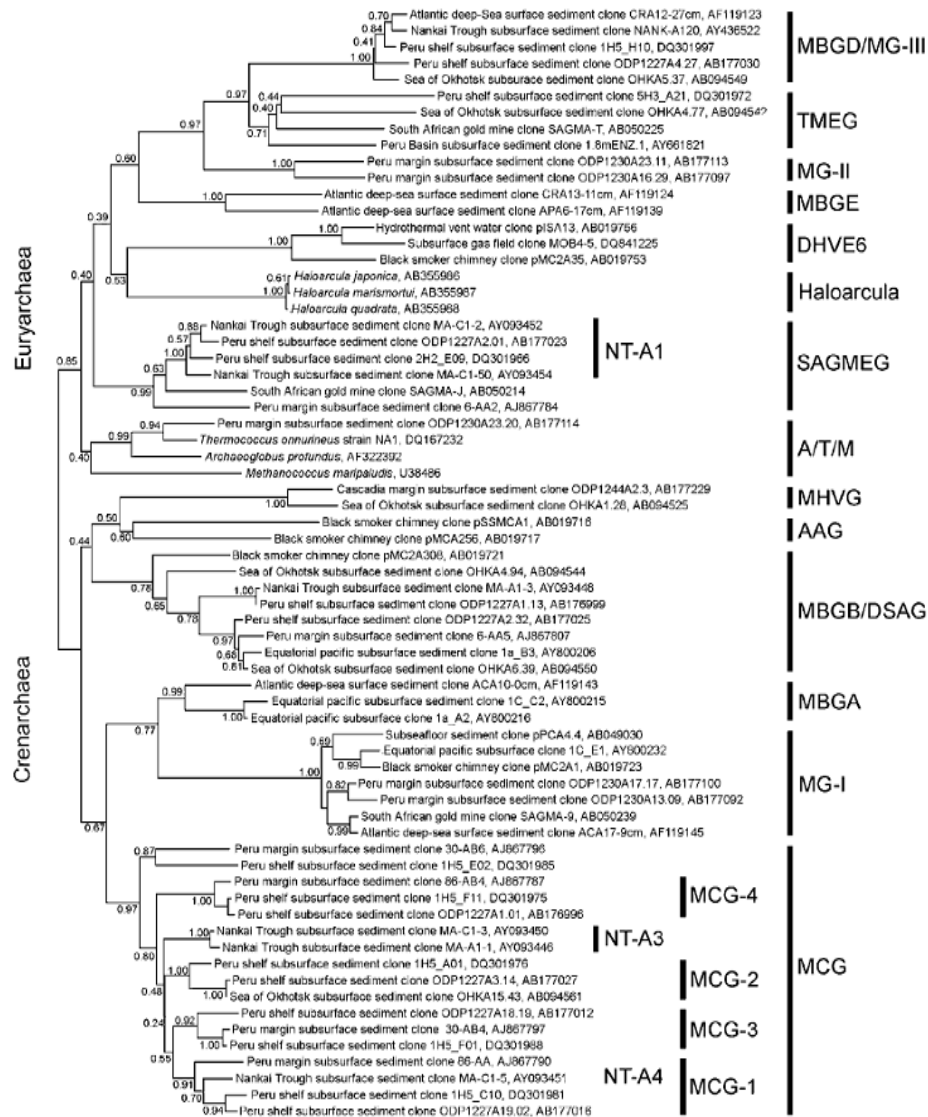


Figure 23: Arbre phylogénétique de groupes d'*Archaea* incultivés, basé sur les gènes codant l'ARNr 16S. D'après Teske *et al.* (2008).

Le groupe "Lake Dagow Sediment" (LDS) : les séquences *Archaea* affiliées au LDS ont été découvertes dans des sédiments anoxiques froids (7.5°C) du Lac Dagow en Allemagne (Glissman *et al.*, 2004). Comme pour les RC-V, les LDS ont été trouvés dans des eaux côtières de la rivière Mackenzie au Canada. Les représentants de ce groupe LDS pourraient également participer à la dégradation de la matière organique (Galand *et al.*, 2006). Les *Archaea* LDS dominent les banques de gènes dans les échantillons de sédiments des couches oxiques des lacs méromictiques du Canada (Pouliot *et al.*, 2009).

Le Crenarchaeota "Marine Group I" (MG-I): la lignée *Archaea* du groupe MG-1 a été observé pour la première fois dans les eaux oxygénées de surface de Santa

Barbara (DeLong *et al.*, 1992). Par la suite des représentants du MG-1 ont été détectés dans des masses d'eaux froides en Californie (Fuhrman *et al.*, 1992); dans du pico plancton d'eaux froides (-1.5°C) d'Antarctique (DeLong *et al.*, 1994); et dans les eaux d'un système hydrothermal profond au Japon (Takai *et al.*, 2004). Des séquences appartenant au MG-I ont été détectées dans des sédiments de l'Océan Atlantique (Vetriani *et al.*, 1999). La plupart des MG-I ont été détectés dans les couches sédimentaires superficielles, alors que certains ont été isolés de sédiments anoxiques profonds. Les MG-I ont aussi été trouvés dans des sédiments oligotrophes de l'est Pacifique (Inagaki *et al.*, 2006). Le premier représentant cultivé (souches SCM1) affilié au MG-I est un *Crenarchaeota* aérobie, chimio-lithoautotrophe, qui oxyde l'ammoniac en nitrite (Könneke *et al.*, 2005). L'*Archaea* aérobie nitrifiante, souche SCM1 a été isolée d'un aquarium tropical à Seattle. C'est un bâtonnet droit est mésophile. D'autre part, d'autres preuves directes basées sur l'analyse phylogénétique d'échantillons provenant de la colonne d'eau de lacs méromictiques au Canada suggèrent que les MG-I sont probablement impliqués dans l'oxydation de l'ammoniac (Pouliot *et al.*, 2009).

Le "Miscellaneous Crenarchaeotic Group" (MCG) : d'abord nommé "Terrestrial Miscellaneous Crenarchaeotic Group" par Takai *et al.* (2001), le groupe d'*Archaea* incultivés a été renommé MCG par Inagaki *et al.* (2003), après la découverte de séquences similaires dans des sédiments de surface comportant des couches de cendres volcaniques, dans la Mer d'Okhotsk, au Japon. Les MCG ont été détectés dans le Pacifique Est dans des sédiments riches en matière organique et en méthane (Inagaki *et al.*, 2006), où ils dominent les banques de gènes. Des séquences appartenant probablement à des organismes du MCG ont été trouvés dans des eaux riches en fer et en manganèse provenant du réservoir Horsetooth (Stein *et al.*, 2002). Des séquences appartenant au MCG correspondant probablement à des organismes métaboliquement actifs ont été détectées dans des sédiments profondément enfouis de la Marge continentale Péruvienne. Les auteurs proposent que les microorganismes dont les séquences sont affiliées au MCG pourraient oxyder le méthane sans assimiler son carbone pour la biomasse (Biddle *et al.*, 2006). Dans la même région dans des sédiments riches en sulfate collectés au-dessus de la ZTMS, des séquences des gènes codant l'ARNr 16S révèlent que

des représentants du groupe MCG sont actifs et dominent les banques de gène (Sorensen *et al.*, 2006).

Le "Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group" 4 et 6 (DHVE-4/6) : cette lignée phylogénétique a été découverte dans des échantillons d'eaux et de sédiments de sites hydrothermaux au Japon, (Takai et Horikoshi, 1999). Des séquences appartenant au DHVE-6 ont été détectés en association avec le tube du vers *Alvinella pompejana*, dans le champs hydrothermal de la Ride Est pacifique (Moussard *et al.*, 2006). Ces vers ont été collectés sur la paroi d'un édifice hydrothermal actif. De façon surprenante, des gènes codant l'ARNr 16S affiliés au DHVE-6 ont été trouvés dans du plancton d'eau douce (environ 10°C) d'un étang soumis à des conditions suboxiques, collectés dans les bois de l'université d'Orsay (Briée *et al.*, 2007).

Le "Marine Benthic Group" (MBG) : la lignée phylogénétique MBG a été détectée pour la première fois dans des sédiments profonds anoxiques collectés dans l'Océan Atlantique (Vetriani *et al.*, 1999).

Le groupe E (MBG-E) est monophylétique, et représente une composante mineure des inventaires moléculaires. Les MBG-E ont été observés dans des échantillons de sédiment d'estuaire de rivière (Abreu *et al.*, 2001); d'une cheminée hydrothermale riche en sulfures de la dorsale Juan de Fuca (Schrenk *et al.*, 2003); et dans des champs hydrothermaux du site Rainbow de la dorsale Atlantique (Nercessian *et al.*, 2005).

Le groupe D (MBG-D) a été détecté dans des étangs d'une fabrique de sel dont la salinité est de 8% (Benlloch *et al.*, 2002); et dans des sédiments profonds de la Marge Péruvienne (Webster *et al.*, 2006). D'autres séquences appartenant au MBG-D ont été isolées des sédiments riches en sulfate peuplés par des colonies de *Calyptogena* à Hydrate Ridge (Knittel *et al.*, 2005).

Le groupe B (MBG-B) (Teske *et al.*, 2008) représente une des lignées dominantes dans les banques de gènes. Les lignées du MBG-B sont présentes dans un grand nombre d'habitats marins anoxiques, comprenant des tapis microbiens de la Mer Noire (Knittel *et al.*, 2005); des sédiments de surface du Golfe du Mexique (Lloyd *et al.*, 2006); des sédiments de la Mer d'Okhotsk (Inagaki *et al.*, 2003); et divers sites hydrothermaux comme le Bassin de Guaymas (Takai et Horikoshi, 1999; Teske *et*

al., 2002). L'étude des séquences d'ARNr 16S reflète l'activité métabolique des MBG-B dans des sédiments marins profonds de la marge péruvienne (Biddle *et al.*, 2006). L'habitat des membres du MBG-B ne se limite pas aux sédiments de la ZTMS, mais comprend également des sédiments dominés par une activité de méthanogenèse (Inagaki *et al.*, 2006).

Le "Terrestrial Miscellaneous Euryarcheotal Group" (TMEG) : à l'origine les inventaires moléculaires à partir d'échantillons d'eau anoxiques au niveau des mines d'Afrique du Sud ont montré la présence de séquences affiliées à la nouvelle lignée phylogénétique TMEG (Takai *et al.*, 2001). Les séquences appartenant au TMEG ont aussi été détectées dans des échantillons d'un aquifère contaminé par des chlorures et des hydrocarbures (Dojka *et al.*, 1998). D'autres représentants du TMEG ont également été détectés dans des sédiments riches en matière organique et en méthane provenant de l'océan Pacifique Est (Inagaki *et al.*, 2006). Enfin, les TMEG ont été détectés dans les inventaires moléculaires obtenus à partir d'échantillons de sédiments marins oxygénés et froids (0.5-0.6°C) de la Mer de Corée (Park *et al.*, 2008). Ce groupe forme un groupe affilié aux MBG-D (Teske *et al.*, 2008).

Le "Sippenauer Moor Group" 1 (SM1) : a été découvert dans des cours d'eau froids riches en sulfures (10-13°C) du marais Sippenauer Moor, en Allemagne (Rudolph *et al.*, 2004). Des microorganismes présentant une morphologie en "collier de perles" ont été observés, chaque perle étant constituée d'une *Archaea* incultivée non-méthanogène appelée SM1, proche des RC-V. Les perles sont reliées entre elles par des bactéries filamenteuses sulfo-oxydantes appartenant au genre *Thiotrix*. L'existence d'une association syntrophique ou symbiotique entre les deux microorganismes a été proposée.

Les amorces disponibles pour les études des gènes codant l'ARNr 16S des *Archaea* ne permettent pas d'amplifier les séquences de certains groupes d'uncultivés (DHVE-6, Marine Hydrothermal Vent Group, ou Ancient Archaeal Group par exemple) en raison de nombreux mésappariements. Ainsi, il est probable qu'une plus grande diversité d'*Archaea* colonise les sédiments marins (Teske *et al.*, 2008). La détection de ces *Archaea* pourrait changer notre vision de la vie sur Terre.

III – OBJECTIFS

Le programme européen HERMES (Hotspot Ecosystem Research on the Margins of European Seas) avait pour objectifs d'étudier la biodiversité, la structure, la fonction, et la dynamique des écosystèmes soumis à des circulations de fluides froids au niveau des marges continentales européennes.

Dans le cadre du programme HERMES, notre groupe à l'Ifremer centre de Brest s'est intéressé à l'étude des communautés microbiennes anoxygènes appartenant au domaine des *Archaea*, et impliquées dans le cycle du méthane. Au cours de deux campagnes océanographiques (VICKING et MEDECO), deux sites ateliers ont été explorés: les marges continentales Norvégienne et Méditerranéenne. La conséquence directe de la circulation de fluides à travers la couverture sédimentaire est la présence de reliefs sous-marins caractéristiques tels que les pockmarks, les volcans de boue ou encore les lacs de saumures, considérés comme des fenêtres ouvertes sur une biosphère profonde et représentant des cibles privilégiées pour les études microbiologiques.

Ainsi, les objectifs poursuivis dans le cadre de cette thèse étaient les suivants:

- ◆ étudier la diversité et distribution des communautés microbiennes dans les écosystèmes sédimentaires marins des marges continentales européennes.
- ◆ identifier la diversité fonctionnelle des communautés méthanogènes, méthanotrophes et sulfato-réductrices.
- ◆ déterminer les voies de méthanogenèse responsables de la production de méthane.
- ◆ caractériser les interactions possibles entre les communautés microbiennes et les gradients géochimiques.
- ◆ étudier les relations trophiques entre les communautés microbiennes et la faune animale.

La stratégie adoptée pour cette étude reposait sur l'utilisation d'outils de biologie moléculaire (PCR-DGGE, construction de banques de clones basées sur l'ADN génomique ou l'ARNr 16S) pour étudier la diversité des communautés microbiennes associées aux écosystèmes froids de marges continentales.

III – OBJECTIVES

The goals of the HERMES (Hotspot Ecosystem Research on the Margins of European Seas) european program were to study the biodiversity, structure, function, and dynamic of ecosystems in cold seeps of european continental margins.

Within the HERMES program, our group at the Ifremer center of Brest focused its research on the archaeal anoxic microbial communities, involved in the methane cycle. Two oceanographic cruises (VICKING and MEDECO) allowed us to explore the Norwegian and Mediterranean continental margins. Direct consequence of fluids circulation through the sediments is presence of typical submarine structures such as pockmarks, mud volcanoes, or even brine lakes. These structures are considered to be open windows to a deep biosphere, and hence represent specific targets for microbiological studies.

Therefore, the main objectives of this thesis were:

- ◆ to study the diversity and distribution of microbial communities in sedimentary ecosystems of european continental margins.

- ◆ to identify the functional diversity of the methanogenic, methanotrophic, and sulfate-reducer communities.

- ◆ to determine the methanogenic pathways responsible for production of methane.

- ◆ to characterize the possible interactions between the microbial communities and the geochemical gradients.

- ◆ to study the trophic relationships between the microbial communities and the marine fauna.

We chose a strategy based on molecular methods (PCR-DGGE, gene library constructions based on genomic DNA, and RNA) to study the diversity of microbial communities associated with cold seep ecosystems of continental margins.

RESULTATS

PRÉAMBULE GENERAL

Une hypothèse récente propose que les migrations de fluides dans les écosystèmes sédimentaires pourraient influencer la distribution spatiale et les activités des communautés chimiosynthétiques. En effet, l'intensité des fluides advectifs ascendants semble être un facteur déterminant dans la structuration des habitats des écosystèmes des zones d'émissions de fluides froids, en régulant la disponibilité des accepteurs d'électrons et donc les activités des communautés microbiennes.

Ainsi, dans le but de conforter cette hypothèse, nous proposons dans ce travail de thèse de distinguer des structures géologiques de fonds de mer selon les régimes de flux de fluides: (i) centres de volcans de boue (émission directe), (ii) sédiments recouverts de tapis microbiens, et (iii) sédiments colonisés par des communautés animales. Afin de vérifier d'une part, l'impact possible des débits de fluides (caractéristiques de l'intensité de l'activité géologique) à la fois sur les gradients géochimiques, et sur la dynamique des communautés microbiennes associées; et afin de proposer d'autre part une hypothèse de fonctionnement de l'écosystème, plusieurs zones géographiques ont été sélectionnées. En effet, quatre sites d'émissions de fluides froids ont été étudiés (marges continentales des mers de Norvège et Méditerranée). Chaque étude fait l'objet d'un chapitre rédigé sous forme d'un article scientifique soumis et/ou en cours de préparation.

La mer de Norvège a été explorée lors de la campagne française "VICKING", dans deux régions particulières : le glissement sous-marin géant de Storegga, et le pockmark G11 de Nyegga. Brièvement, les échantillons de sédiments provenant du site de Storegga étaient peuplés de vers tubicoles appartenant à la famille des Siboglinidés (Chapitre 4). Et les échantillons de sédiments du pockmark G11 du site Nyegga étaient recouverts de tapis microbiens de couleur marron-vert (Chapitre 3). De plus, des vers tubicoles ont été observés adjacents à ces tapis.

Au cours d'une seconde campagne française "MEDECO" en Mer Méditerranée, deux volcans de boue ont été échantillonnés: Napoli au large de la Crète, et Amsterdam au large de la Turquie. La deuxième partie de cette campagne

était dédiée à l'exploration du delta profond du Nil, dont une zone de pockmarks. L'étude microbiologique des sédiments provenant des centres actifs des volcans de boue Napoli et Amsterdam (Chapitre 1), ainsi que des sédiments associés à un tapis microbien de couleur orange de Napoli (Chapitre 2) a été entreprise. Enfin une étude préliminaire portant sur des échantillons de sédiments associés aux zones de pockmarks de la partie centrale du delta profond du Nil est présentée dans le Chapitre 5.

GENERAL PRESENTATION

A recent hypothesis proposes that fluid flows could influence spatial distribution of chemosynthetic communities in sedimentary marine ecosystems. Indeed, the intensity of ascending advective fluids seems to be a key factor determining the structure of cold seep ecosystem habitats, by regulating the availability of electron acceptors and thus activities and distribution of microbial communities.

Hence, in order to consolidate this hypothesis, we propose to distinguish submarine geological structures as subjected to different fluid flow regimes: mud volcano active centers (direct methane emission), sediments covered by microbial mats, and sediments colonized by submarine fauna. Several geographical areas were selected during this thesis, in order to assess a possible impact of fluid flows (characteristic of geological activity intensity) on geochemical gradients and on the dynamics of the associated microbial communities; and also in order to postulate on the functioning of cold seep ecosystems at continental margins. Indeed, four cold seep sites were examined, belonging to two European continental margins (Norwegian, and Mediterranean Margins), and the results are presented as a scientific article submitted or in preparation.

The Norwegian Sea was explored during the French VICKING cruise, in two particular sites: the Storegga Slide, and the G11 pockmark of Nyegga. Briefly, sediment samples from the Storegga Slide were colonized by Siboglinid tubeworms (Chapitre 4), and sediment samples from the G11 Nyegga pockmark were covered with brown-green colored microbial mats (Chapitre 3). Furthermore, tubeworms were observed close to these microbial mats.

During the French MEDECO cruise in the Mediterranean Sea, two mud volcanoes were sampled: Napoli off Crete, and Amsterdam off Turkey. The second part of the cruise focused on the exploration of the Nile Deep Sea Fan, in particular two pockmark areas. Sediments recovered from the active centers of the Napoli and Amsterdam mud volcanoes (Chapitre 1), and sediments associated with orange-pigmented microbial mats of the Napoli mud volcano (Chapitre 2) were analysed. Finally, preliminary results on sediment samples of the pockmark areas of the central Nile Deep Sea Fan are presented in the Chapitre 5.

CHAPITRE 1

**Etude de la diversité et de l'activité des
méthanogènes dans les sédiments de centre actif de
volcans de boue de la Mer Méditerranée**

Préambule

Bien que les fluides émis au niveau des sédiments des marges continentales soient fortement enrichis en méthane principalement produit par voie biogénique, il existe à ce jour peu de données relatives à la diversité des *Archaea* méthanogènes, et/ou aux voies métaboliques de production de méthane dans les sédiments marins. Seul un nombre restreint de méthanogènes ont été isolés en culture pure à partir de sédiments marins, et les données moléculaires portant sur l'étude des communautés méthanogènes demeurent fortement limitées.

Les maxima d'activité dans un volcan de boue sont le plus souvent localisés au niveau de leurs centres actifs, au niveau desquels sont expulsés de la boue, des fluides, et du gaz dont le méthane. Les communautés microbiennes de surface influencées par les expulsions de boue sont sûrement connectées à des réservoirs profonds et chauds de la biosphère de souterraine.

Dans le but d'étudier les voies de production de méthane, ainsi que la diversité des communautés méthanogènes, nous avons échantillonné les centres des volcans de boue Napoli et Amsterdam; qui contiennent *a priori* les sédiments soumis aux plus forts flux de fluides des zones étudiées dans cette thèse. Ces volcans de boue sont deux exemples typiques de structures géologiques sous-marines dynamiques, et permettent d'étudier la résilience des communautés microbiennes en réponse aux changements rapides des conditions environnementales. Le volcan de boue Amsterdam (premier article présenté dans ce chapitre) est caractérisé par des forts gradients de températures et une forte activité, ainsi que par la présence d'une couche d'hydrates de gaz au centre du volcan. Le volcan de boue Napoli (deuxième article présenté) est caractérisé par des températures plus faibles ($\approx 14^\circ\text{C}$), ainsi que par des remontées de fluides riches en sels à partir de réservoirs profonds.

Pour répondre à ces objectifs, les taux d'activité de méthanogenèse basés sur trois types de substrats utilisés par les méthanogènes ont été mesurés. La distribution des communautés *Archaea* en fonction de la profondeur d'enfouissement a été étudiée par la technique de PCR-DGGE. Enfin, la distribution des communautés méthanogènes et/ou méthanotrophes anaérobies en fonction de la profondeur de sédiment a été analysée par la construction de banques de clones basées sur les gènes *mcrA*, et par l'utilisation de cultures d'enrichissement.

Methanogenesis in the active center of the Amsterdam mud volcano, Eastern Mediterranean Sea

(in preparation)

Cassandre Sara Lazar¹, R. John Parkes², Barry A. Cragg², Stéphane L'Haridon¹, Daniel Prieur¹, and Laurent Toffin¹

¹Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, IFREMER Centre de Brest, Département Etudes des Environnements Profonds, Université de Bretagne Occidentale, BP70, 29280 Plouzané, France.

²School of Earth, Ocean and Planetary Sciences, Cardiff University, Main Building, Park Place, Cardiff CF103YE, UK.

Correspondance: Laurent Toffin, Tel. : +33(0)2 98 22 43 96, Fax. +33(0) 98 22 47 57, e-mail: Laurent.toffin@ifremer.fr.

ABSTRACT

Mud volcanoes are geological structures emitting large amounts of methane from their active centers. The Amsterdam mud volcano, located in the Anaximander Mountains south of Turkey, is characterized by intense active methane seepage which is mainly of biogenic origin. High methane venting could be linked to gas hydrate destabilization, since gas hydrates are assumed to be present within the center of the mud volcano. Methanogenic activity rate measurements show that acetate is the dominant pathway in sediments of the Amsterdam mud volcano, which is corroborated by high acetate sediment porewater concentrations. Methylo-trophic methanogenesis was measured all along the sediment core, and molecular analysis detected *Methanosarcinales* affiliated sequences, and enrichment cultures showed presence of *Methanococcoides* in the shallow sediment layers. These results suggest that methylo-trophic methanogens are able to find substrates supporting their growth in many microhabitats. H₂/CO₂ methanogenesis activity was also measured, but was much lower than acetate methanogenesis, which is unusual for cold seep sediments. ANME-1 and ANME-2c sequences were recovered using PCR-DGGE and *mcrA* gene library construction methods, which could imply that AOM occurred in the Amsterdam mud volcano sediments.

INTRODUCTION

Submarine mud volcanoes are found at active and passive continental margins, (Dimitrov and Woodside, 2003). Mud volcanoes are formed by expulsion of fluids, gas, and mud originating from subsurface reservoirs (Milkov, 2000). The Anaximander Mountains, south of Turkey, are associated with very active tectonic deformation (Charlou *et al.*, 2003), and show evidence of active fluid seepage (Haese *et al.*, 2006). The Anaximander Mountains are also associated with faults allowing overpressured fluids to be erupted at the seafloor (Charlou *et al.*, 2003). Among the mud volcanoes composing the Anaximander Mountains, is the Amsterdam mud volcano (Fig. 1). It displays rough morphology with depressions and scars, and substratum is characterized by lots of carbonate crusts and muddy areas (Olu-Le Roy *et al.*, 2004).

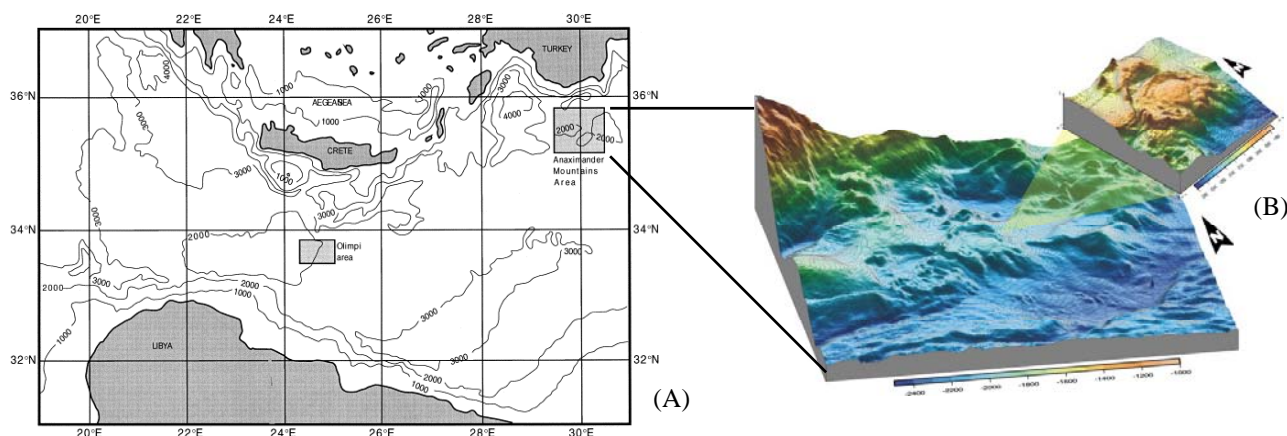


Figure 1. (A) Location map showing the Anaximander Mountains, of the Eastern Mediterranean Sea. From Aloisi *et al.* (2001). (B) Regional 3D map of the Anaximander Mountains and focused 3D map of the Amsterdam mud volcano. From Lykousis *et al.* (2009).

High methane concentrations were measured in the seawater column above Amsterdam (Charlou *et al.*, 2003). Moreover, gas hydrates were collected in Amsterdam, and a methane gas supply from deeper formations could be located within the central part of the mud volcano (Lykousis *et al.*, 2009). The presence of these gas hydrates could be explained by gas hydrate destabilization. Degassing in Amsterdam is linked with high turbidity, and hence the Amsterdam mud volcano is characterized as a high methane venting and extensive turbid fluid expulsion mud volcano (Charlou *et al.*, 2003). The central part of Amsterdam is probably comprised

of expelled mud, and the distribution of fauna suggests that chemosynthetic activity is high on Amsterdam (Olu-Le Roy *et al.*, 2004).

Most of the gas venting from Amsterdam are composed of methane, whose origin is mainly biogenic (Charlou *et al.*, 2003), and is produced by methanogenic *Archaea*. Methanogenesis is the final step in the fermentation of organic matter in marine sediments. Methanogens can use three different types of carbon sources as catabolic substrates for methane production: hydrogenotrophs use H_2/CO_2 , acetoclasts use acetate, and methylotrophs use methylated compounds (Garcia *et al.*, 2000). Few studies have specifically focused on activity or diversity of methanogens in cold seeps or mud volcanoes (Dhillon *et al.*, 2005; Kendall and Boone, 2006; Parkes *et al.*, 2007; Yoshioka *et al.*, 2009), and few methanogens have been isolated and cultured from marine sediments. The highest fluid flows are generally located in the physical center of the mud volcanoes. However, most (>90%) of the uprising methane is consumed by anaerobic oxidation of methane (AOM) before it reaches the seafloor (Knittel and Boetius, 2009). AOM is mediated by methanotrophic *Archaea* (ANME), and is usually coupled to sulfate reduction (Boetius *et al.*, 2000; Knittel *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2006b). Based on the 16S rRNA gene phylogeny, ANME are divided in three distinct clusters, namely ANME-1, ANME-2 and ANME-3, phylogenetically distantly or closely related to methanogens (Lösekann *et al.*, 2007). The close phylogeny between the ANME and methanogens and the biochemical link of both pathways in the methane cycle suggest a co-evolution in their biochemistry (Knittel and Boetius, 2009). Hence some authors propose that the initial step in methane oxidation is a reversal of the terminal reaction of methane production, catalyzed by the methyl coenzyme M reductase (MCR). The *mcrA* gene, which encodes the MCR, is unique and found in all methanogens and anaerobic methanotrophs (Thauer, 1998).

The methanogenic community diversity in centers of mud volcanoes is not well characterized to date. Hence, in this study we sought to analyze the pathways for methanogenesis, as well as community structure of methanogens in the center of the Amsterdam mud volcano. Methanogenic activities based on the three substrate types were measured. Vertical distribution of *Archaea* were monitored using PCR-DGGE and *mcrA* gene libraries were constructed to analyze the methanogenic and anaerobic methanotrophic communities diversity.

MATERIALS AND METHODS

Site description and sediment sampling.

Sediment samples were collected from the Amsterdam mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea, in the Anaximander Moutains, during the Ifremer MEDECO cruise with the research vessel Pourquoi Pas? in October/November 2007. Gravity core KUL-6 (N 35°19.911, E 30°16.1246) measuring 6 metres was recovered from the center of the Amsterdam mud volcano at 2028 metres of water depth. Temperature gradients were measured using sensors attached to an additional "duplicate" gravity core KUL-5 (N 35°20.003, E 30°16.2757, 2029 meters depth) close to KUL-6. A second core equipped with thermal probes KUL-7 (N 35°19.911, E 30°16.1246, 2028 meters depth) was recovered from the center of the Amsterdam mud volcano (about 250 m to the SW of KUL-5 and KUL-6) KUL-7 was located in the active center of eruption of the mud volcano, as inferred from the microbathymetric map produced during the cruise (J-P Foucher, pers. comm.).

Immediately after retrieval, the KUL-6 core was sectioned aseptically in 50-cm-thick layers in the cooling room (4°C), and mini-cores of sediment were removed for gas and molecular analysis. Samples for molecular analysis were collected by using cut-off sterile 5 mL syringes in the 50 cm sediment sections of KUL-6 and were frozen at -80°C for nucleic acid extractions. The 250-300 and 300-350 cm sections of the KUL-6 core contained gas pockets probably as a result of gas hydrate destabilisation during recovery, hence the sediment was only used for geochemistry and rates measurements. Half of the 50 cm layers of the KUL-6 sediments were flushed with nitrogen, hermetically sealed in aluminium bag-rolls (Grüber-Folien, Germany), and transported to the laboratory at 4°C for subsequent methanogenesis rate measurements and pore water analysis.

Geochemistry.

Porewater was obtained by centrifuging approximately 10 g of crude sediment for 15 minutes at 3000 x g at 4°C. The porewater was then stored at -20° until required. Depth distribution of dissolved cations were quantified from diluted porewater using standard ion chromatographic techniques, at the Ifremer laboratory. Cation concentrations were measured using ion exchange chromatography, with a isocratic DX120 ion chromatogtaphy system (DIONEX Corporation, Sunnyvale, CA) fitted with Ionpac CS 12A columns and a suppressor (CSRS-ultra II) unit in combination with a

DS4-1 heated conductivity cell. Components were separated using a methanesulfonic acid (18mM) gradient, with a flow of 1 ml min⁻¹.

Approximately 10 g of crude sediment samples were placed in a pressing bench (KC Denmark A/S). An over-pressure of argon was applied to expel pore water from sediments. Pore water sulfate and acetate concentrations were measured by ion exchange chromatography using an ICS-2000 ion chromatography system (Dionex®, UK) fitted with two AS15-HC 4 mm columns in series, and a Dionex® Anion Self-Regenerating Suppressor (ASRS®-ULTRA II 4-mm) unit in combination with a Dionex®DS6 heated conductivity cell, Cardiff University, UK. Components were separated using a potassium hydroxide gradient program as follows: 6.0 mM KOH (38 min isocratic), 16.0 mM KOH min⁻¹ to 70 mM (17 min isocratic).

Methane concentrations were measured on board in triplicate from 1 mL sediment samples using a cut syringe. The sediment was transferred immediately to a 30 mL sediment vial prefilled with 4 mL of NaOH (2.5%), that was quickly crimp sealed with a butyl rubber stopper. Vials were shaken to make a homogenous suspension and equilibrated upside-down for several hours at room temperature prior to gas analysis. Dissolved methane content was measured on a gas chromatograph GC (HSS-GC) equipped with a thermal-conductivity detector (TCD) and a flame-ionisation detector (error of 4%) (details in Sarradin and Caprais, 1996). Due to oversaturation in dissolved gases in the sediments, gas content was underestimated because of gas decompression during core retrieval and on-deck handling. The methane contents were expressed as peak height values rather than concentrations.

Methanogenesis rate measurements.

Whole round cores for measurements of methanogenesis activity rates were taken every 20 cm and were stored under nitrogen in aluminium bags in a cold room at 4°C until being further processed (three months). Radiotracer experiments using ¹⁴C labelled substrates were conducted in the laboratory at Cardiff University, UK. Intact 5 mL syringe subcores were taken in the center of core, and sealed with sterile Suba Seals and stored in N₂ prior to injection with isotopes. The 5 mL syringes were injected with radiotracers ([¹⁴C]bicarbonate, [¹⁴C]acetate, [¹⁴C]methanol [¹⁴C]methylamine or [¹⁴C]hexadecane and incubated at close to *in situ* temperatures (15°C). Activity was then stopped by freezing before processing in the laboratory. Methane production rates were calculated based on the proportion of labelled gas

produced from the ^{14}C -substrate, the dissolved porewater acetate adjusted for sediment porosity and incubation time. Because incubation conditions were not identical to conditions in the original sediment, measured rates might differ from those *in situ*.

Culture media for enrichment of methanogens.

Enrichment were performed anaerobically in 50 mL vials according to Balch & Wolfe (1976). Medium 141 from the DSMZ were used with slight modifications : organic substrates were omitted except yeast extract with a concentration adjusted to 0.2 g L^{-1} . The medium was prepared and sterilized under 80 % N_2 and 20 % CO_2 gas atmosphere. In order to enrich CO_2 -reducing, acetoclastic and methylotrophic methanogens, three enrichment media supplemented with H_2 (200 kPa), acetate (10 mM), and trimethylamine (TMA, 20 mM) were used. One gram of sediment from all sections of the KUL-6 core were inoculated into 9 mL of medium (pH 7), the suspension was mixed and serially diluted until 10^{-3} . The cultures were incubated at 15°C to mimic close to *in situ* conditions. Cultures were periodically checked for methane production for one year. The methane detection was performed directly in the headspace of vial cultures by a micro MTI M200 Gas Chromatograph equipped with MS-5A capillary column and Poraplot U capillary column. Positive enrichment dilutions of methanogens were monitored by PCR-DGGE. For dilutions showing one DGGE band on the fingerprint, 16S rRNA genes were amplified using the A8F and A1492R primers, cloned and sequenced as mentioned hereafter.

DNA extraction and purification.

Total genomic DNA was directly extracted and purified from 5 g of wet sediment for all 20-cm-thick sections in duplicates, by using the Zhou *et al.* (1996) method with modifications. Sediment samples were mixed with DNA extraction buffer as described by Zhou *et al.*, and then frozen in liquid N_2 then thawed at a 65°C , 3 times. The pellet of crude nucleic acids obtained after centrifugation, was washed with cold 80% ethanol, and resuspended in sterile deionized water, to give a final volume of 100 μL . Crude DNA extracts were then purified using the Wizard DNA clean-up kit (Promega, Madison, WI). DNA extracts were aliquoted and stored at -20°C until required for PCR amplification.

PCR-DGGE amplification of total DNA.

Archaeal 16S rRNA genes were amplified by PCR from purified DNA extracts using the Archaeal targeted primers pair 8F (5'-CGGTTGATCCTGCCGGA-3') and 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Casamayor *et al.*, 2000). All PCR reactions (total volume reaction 25 μ L) contained 1 μ L purified DNA template (1/25 dilution), 1 X PCR buffer (Promega, Madison, WI), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer (Eurogentec) and 0.6 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI). Amplification was carried out using the GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 49°C for 1 min 30 s, and extension at 72°C for 2 min for 30 cycles. All the archaeal 16S rRNA gene PCR products were then re-amplified with primers 340F (5'-CCCTACGGGGYGCASCAG-3') (Vetriani *et al.*, 1999) containing a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3') at the 5' end and 519R (5'-TTACCGCGGCKGCTG-3') (Ovreas *et al.*, 1997). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 72°C to 62°C (touchdown -0,5°C.cycle⁻¹) for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 20 cycles, then denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 10 cycles, final extension at 72°C for 30 min (Janse *et al.*, 2004).

To restrict contamination to a minimum, PCR experiments was carried out under aseptic conditions (Captair® bio, Erlab, Fisher Bioblock Scientific) using autoclaved and UV-treated plasticware and pipettes, and only sterile nuclease-free molecular grade water (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Positive (DNA extracted from pure cultures) and negative (molecular grade water) controls were used in all PCR amplifications.

DGGE fingerprinting analysis, band excision and sequencing.

DGGE was carried out as described by Webster *et al.* (W2003) with some modifications. PCR products were separated by DGGE using the D-Gene™ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) on 8% (w/v) polyacrylamide gels (40% acrylamide/bis solution 37.5:1 Bio-Rad) with a gradient of denaturant between 20% and 60%. A denaturing gradient gel consists of [100% denaturant equals 7M urea and 40% (v/v) formamide]. Gels were poured with the aid of a 30 mL volume Gradient Mixer (Hoefer SG30, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and prepared

with 1 X TAE buffer (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Electrophoresis was carried out at 60°C, 200 V for 5 hours (with an initial electrophoresis for 10 min at 80 V) in 1 X TAE buffer. Polyacrylamid gels were stained with SYBRGold nucleic acid gel stain (Invitrogen, San Diego, CA) for 30 min, and viewed using the Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Individual DGGE bands of interest were excised and washed in sterile-nuclease free molecular grade water for 10 min. Bands were then air-dried and crushed in 10-20 µL molecular grade water and incubated overnight at 4°C. The supernatant (1µL) was used as template DNA in a nested PCR using primer set 340F and 519R. The PCR products of excised DGGE bands were sequenced with primer 519R, using an ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the OUEST-Genopôle platform of Roscoff Marine laboratory (France).

***mcrA* PCR amplification, and cloning.**

Genes coding for the alpha subunit of the methyl- coenzyme M-reductase's (*mcrA*) were amplified using the ME1 (5'-GCMATGCARATHGGWATGTC-3') and ME2 (5'-TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT-3') primers (Hales *et al.*, 1996). The PCR conditions were as follows : denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 50°C for 1 min 30 s, and extension at 72°C for 3 min for 30 cycles. PCR products were purified with the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and analyzed on 1% (w/v) agarose gels run in 1 X TAE buffer stained with ethidium bromide and then UV-illuminated. Purified PCR products were cloned into TOPO[®] XL PCR Cloning Kit, and transformed into *Escherichia coli* TOP10 One Shot[®] cells (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations.

DNA sequencing and phylogenetic analysis.

16S rRNA and *mcrA* gene sequences were obtained using BigDye terminator chemistry and determined on a ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer automated capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cloned 16S rDNA and *mcrA* gene fragments were sequenced using the M13 reverse primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') universal primer and analyzed using the NCBI BLASTN search program within GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul *et al.*, 1990). The presence of chimeric sequences in the clone libraries was determined with the CHIMERA CHECK program of the Ribosomal Database Project

II (Center for Microbial Ecology, Michigan State University, <http://wdcm.nig.ac.jp/RDP/html/analyses.html>). Potential chimeras were eliminated before phylogenetic trees were constructed. The *mcrA* sequences were then edited in the BioEdit v7.0.5 program (Hall, 1999), translated into amino acid sequences, and aligned using ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). Sequence data was analysed with the MEGA4.0.2 program (Tamura *et al.*, 2007). The phylogenetic trees were calculated by the neighbour-joining analysis. The robustness of inferred topology was tested by bootstrap resampling (1000).

Rarefaction curves were calculated for each *mcrA* clone library using the RarFac program (<http://www.icbm.de/pmbio/>), and we used a 95% similarity level to define the groups of sequences. Libraries' coverage was calculated using the following formula: $C=[1-(n_1/N)]*100$, where n_1 is the number of unique OTUs, and N is number of clones in the library (Singleton *et al.*, 2001).

Nucleotide sequence accession numbers.

The sequence data reported here will appear in GenBank nucleotide sequence databases under the accession no. XXX to XXX for *mcrA* genes and XXX to XXX for DGGE bands. Sequences obtained from enrichments are no. XXX to XXX.

RESULTS

Geochemical characteristics.

Sediment temperatures were measured on duplicate cores KUL-5 and KUL-7, close to where the KUL-6 gravity core was recovered in the center of the Amsterdam mud volcano. Temperature gradients on KUL-5 indicated a significant increase with depth, from 14 °C at the seabed to 21°C at 600 cmbsf depth. Temperatures obtained in core KUL-7 were up to 36°C at 600 cmbsf depth. Hence, these results could indicate high seepage activity in the center of the Amsterdam mud volcano (Jean-Paul Foucher, pers. comm.). Based on the thermal gradients, activity of the Amsterdam mud volcano was assumed to be around 10 times higher than in the center of the Napoli mud volcano (Lazar *et al.*, unpublished data). Clasts from mud breccia extruded from depths by the mud volcano were detected in the KUL-6 sediments.

Gas hydrates have been previously observed in the Amsterdam mud volcano (Charlou *et al.*, 2003). Chloride concentrations in sediment pore water were very low (Fig. 2) with an average of 220 mM below 100 cmbsf, up to 2 times lower than normal

seawater values reflecting that gas hydrate dissociation occurred during sample recovery (Dähmann and de Lange, 2003). Profiles of the Mg^{2+} and Ca^{2+} pore water concentrations (Supplementary material. SM1) showed decrease with depth from surface to 100 cmbsf indicating authigenic carbonate precipitation in shallow sediment layers. Because AOM processes lead to a significant increase of alkalinity and inorganic carbon, by producing HCO_3^- , Mg^{2+} and Ca^{2+} cations could be precipitated into carbonates (Knittel and Boetius, 2009). The Na^+ porewater concentrations (Supplementary material. SM1) decreased with depth, and were clearly correlated with variations in Cl^- concentrations.

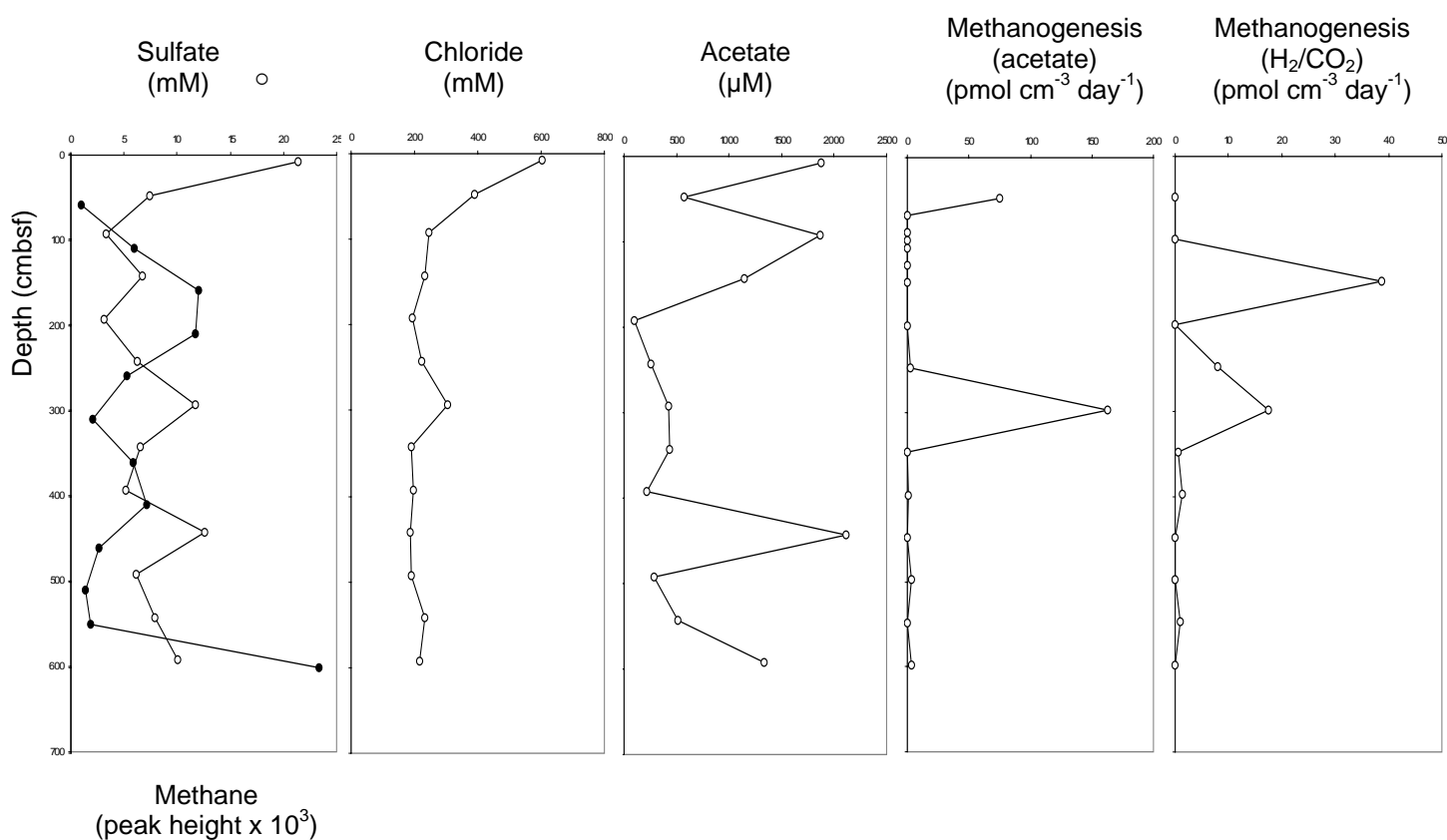


Figure 2. Depth profiles of geochemistry and methanogenic activities in the Amsterdam mud volcano center sediments.

Sulfate concentrations decreased until 3,3 mM at 90 cmbsf (Fig. 2) and never reached depletion even in the deepest sediment layers. Hence, SR could occur in the 100 first centimeters. The irregular profile of sulfate concentrations probably reflected the high turbidity of upflowing fluids in the active center of the Amsterdam mud volcano.

Methane was present in the center of the Amsterdam sediments with the highest content in the deepest part of the core at 600 cmbsf. Dissolved methane content was the lowest at 50 cmbsf, suggesting that the sulfate to methane transition zone (SMZT) could be situated at around 50 cmbsf.

Acetate occupies a central role in the degradation of organic matter in anoxic systems. Furthermore, acetate is a substrate for methanogenesis in marine sediments (Wellsbury *et al.*, 1997). Acetate pore water concentrations (Fig. 2) were extremely high (maximum 2120 μM at 450 cm). The range of acetate concentrations (80-448 μM) were very high compared to seep and non-seep sediments (Newberry *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2007), but also compared to acetate concentrations in sediments of a brine impacted mud volcano in the Gulf of Mexico (maximum 60 μM , (Joye *et al.*, 2009). Acetate concentrations in pore waters of near-surface sediments remain very low because of balance between microbial production and consumption (<15 μM , (Wellsbury *et al.*, 1997). However, high concentrations of acetate were reported in deep oil-reservoir formation waters, probably the consequence of organic matter cracking at temperatures above 80°C (Borgund and Barth, 1994). Hence, methane in deeper sediments might be predominantly produced from acetate rather than H_2 and CO_2 .

Concentrations of dissolved inorganic carbon (free CO_2) increased with depth to reach a maximum of 3.6 mM at 443 cmbsf probably stimulating rates of hydrogenotrophic methanogenesis (Supplementary material. SM2).

Methanogenic activity.

All methanogenic-type activities were measured below 50 cmbsf, supporting the assumption that the SMTZ was situated at 50 cmbsf. Methanol methanogenesis was detected from 47 cmbsf down to 350 cm, with maxima at 150 cmbsf and 300 cmbsf (Supplementary material. SM2). Methylamine methanogenesis was maximum from 47 to 200 cmbsf (Supplementary material. SM2) in the presumed SMTZ, which is in accordance with what is usually observed in marine sediments. The rates of both methylamine/methanol activities were comparable.

H_2/CO_2 methanogenesis (Fig. 2) showed two maximum rates at 150 cmbsf (38.8 $\text{pmol cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$) and 300 cmbsf (17.5 $\text{pmol cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$), and were negligible below 350 cmbsf. Acetate methanogenesis was overall the dominant pathway, with rates 10 times higher than methanol/methylamines methanogenesis, and 10^2 times higher

than H₂/CO₂ methanogenesis. Acetate methanogenesis was measured from 50 to 100 cmbsf (rates at 50 cm: 0.0750 nmol cm⁻³ day⁻¹), and from 200 to 350 cmbsf with a maximum rate at 300 cmbsf (0.1625 nmol cm⁻³ day⁻¹). The peak in acetate methanogenesis at 300 cm seems to be associated with the lowest acetate concentrations measured (420 µM at 300 cm). Detection of acetate methanogenesis between 50 to 100 cmbsf in the presumed sulfate-reducing zone was surprising. Acetate methanogenesis rates were in agreement with the average rates measured in seeps and non-seeps (<0.02 to 6 nmol cm⁻³ day⁻¹; (Parkes *et al.*, 2007). Interestingly, H₂/CO₂ methanogenesis rates were below the usual methane seeps or non-seeps ranges (<0.4 to 30 nmol cm⁻³ day⁻¹ (Newberry *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2007).

Hexadecane was also used for methanogenesis with a unique peak at 150 cmbsf (Supplementary material. SM2) and with activity rates comparable to that of H₂/CO₂ methanogenesis. Hexadecanes may not be directly consumed by methanogens, but could be degraded to methane via a syntrophic consortia (Zengler *et al.*, 1999).

Culturable methanogenic diversity.

Methane was detected in media designed to enrich methylotrophic methanogens (trimethylamine) after two months of incubation at 15°C. Culturable methanogens were present from sediments collected from 0 to 50 cmbsf. Microscopic observations of positive enrichments suggested that methanogens were coccoid-shaped cells in low cell densities. Under UV light, autofluorescent cells of methanogens were detected as free cells.

Total DNA was extracted from 10⁻¹ dilution series of the TMA enriched medium from 0 to 50 cmbsf. Phylogenetic affiliation of the full 16S rRNA sequence of the clone AmK-0_50-enr38 showed 98 % sequence similarity with the closest cultured methanogen *Methanococcoides burtonii* (CP000300).

Methanogenic and Methanotrophic diversity and depth distribution.

The DGGE fingerprints (Fig. 3) generated from DNA samples extracted from sediments associated with the center of the Amsterdam mud volcano displayed a relatively high archaeal diversity. Distribution of archaeal populations with depth also revealed complex and variable 16S rDNA gene patterns. Two lanes corresponding to the 200 to 250 and 500 to 550 cmbsf sections seemed to contain no bands although

PCR products were positive on electrophoresis gels. As we successfully amplified *mcrA* genes from these two sections, it is possible that the 16S archaeal primers that we used did not cover all methanogenic or methanotrophic sequences within the Napoli sediments, as mentioned elsewhere (Newberry *et al.*, 2004). The deepest section (600 to 650 cmbsf) showed only one visible single band, pointing out that the archaeal diversity must be low in deeper sediment layers. The diversity analysis of 16S rRNA genes by DGGE resulted in sequences affiliated in low percentage of similarity, presumably affiliated with anaerobic methanotrophs and methanogens clusters reflecting different niches in the sediment column (Fig. 3). Band sequences Amk-dggeB1 and B9 were affiliated with the ANME-1 group (80 to 86 % of similarity) (Table 1), and bands B7, B10, B13 to B15 with the ANME-2 group (80 to 93 % of similarity). Bands AmK-dggeB4 to B6 were affiliated with the order *Methanomicrobiales* (75 to 81 % of similarity) including hydrogenotrophic methanogens. Bands Amk-dggeB2, B3, B8, B11 and B12 were affiliated with the nutritionally versatile methanogenic order of the *Methanosarcinales* (81 to 94 % of similarity).

According to observed maximum rates of methanogenesis (Fig. 2 and SM2), *mcrA* gene libraries were constructed from sediment depths 100 to 200, and 200 to 250 cmbsf. Unfortunately, sediments samples from 250 to 350 cmbsf were not included in the molecular analysis because of a gas pocket in the core KUL-6. These sediments sections were dedicated to geochemistry and activity rates measurements. Clones analysis of *mcrA* genes libraries obtained from selected sediment depths 100 to 200 cmbsf, yielded a total 21 sequences. A total of only 5 *mcrA* gene sequences from the 200 to 250 cmbsf sediments were determined. Hence, *mcrA* diversity was not completely covered for this sediment section. Archaeal phylogenetic groups in the 200 to 250 cmbsf sediment layers included sequences affiliated with the ANME-1 clade (Supplementary material. SM3), as previously reported in the Amsterdam mud volcano (Heijs *et al.*, 2008). The rarefaction curve generated for the *mcrA* gene library obtained from the 100 to 200 cmbsf indicated saturation (Supplementary material. SM4), while percent coverage was determined to be 66,7 %. Coverage analysis suggested that the full diversity of *mcrA* sequences was not exhausted.

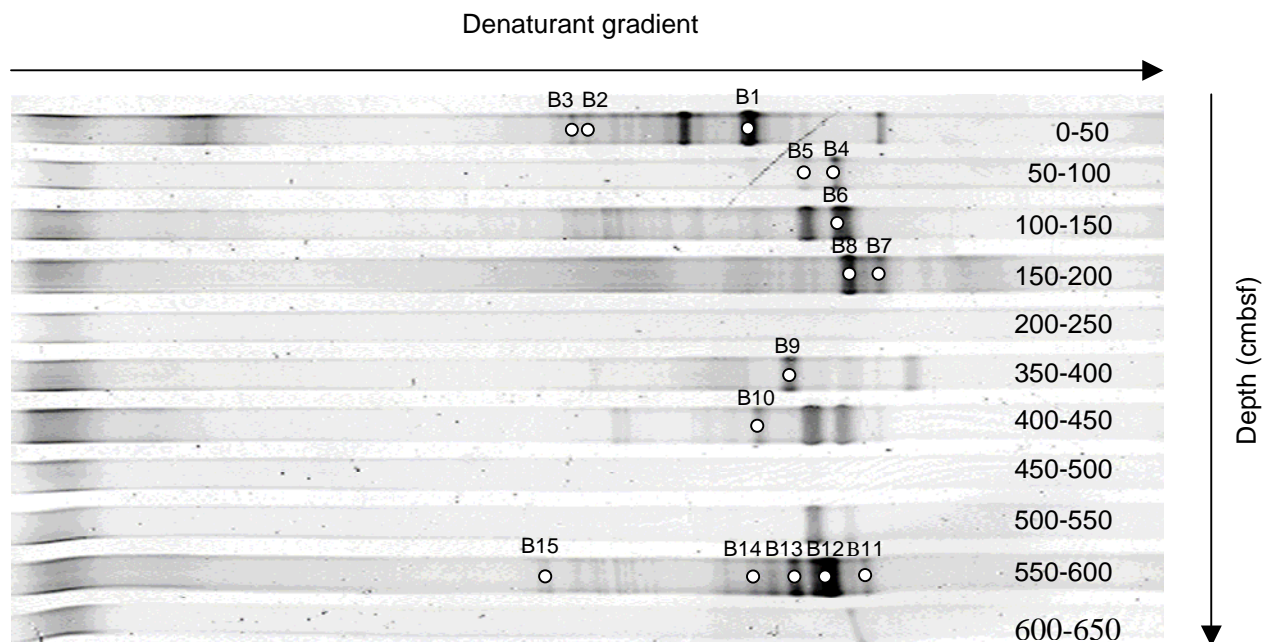


Figure 3. DGGE analysis of archaeal 16S rRNA gene sequences from various sediment depths from the Amsterdam mud volcano. Marked DGGE bands (white dots) were excised and sequenced. Numbers B1 to B15 are bands corresponding to AmK-dggeB1 to AmK-dggeB15.

Phylogenetic affiliation	DGGE band	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)
ANME-1	AmK-dggeB1 (0-50 cm)	Tomm05_1274_3_Arch89 (FM179815) Gulfaks and Tommeliten methane seeps, Northern North Sea	80
	AmK-dggeB9 (350-400 cm)	HydCal52 (AJ578120) Hydrate Ridge and Black Sea sediments	86
ANME-2	AmK-dggeB7 (150-200 cm)	Tomm05_1274_3_Arch40 (FM179816) Gulfaks and Tommeliten methane seeps, Northern North Sea	85
	AmK-dggeB10 (400-450 cm)	FE2MidArch1 (AY769047) Sulfide and methane-rich cold seep sediments located at the base of the Florida Escarpment	81
	AmK-dggeB13 (550-600 cm)	AMOS1A_4113_G08 (AY323222) Continuous-flow bioreactor, Monterey Bay	80
	AmK-dggeB14 (550-600 cm)	Tomm05_1274_3_Arch82 (FM179835) Gulfaks and Tommeliten methane seeps, Northern North Sea	81
	AmK-dggeB15 (550-600 cm)	Tomm05_1274_3_Arch82 (FM179835) Gulfaks and Tommeliten methane seeps, Northern North Sea	93
<i>Methanosarcinales</i>	AmK-dggeB8 (150-200 cm)	Cas20#4 (AJ290573) Deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin	94
	AmK-dggeB12 (550-600 cm)	IV.4.Ar4 (AY367332) Seawater and Sediments of the Cascadia Margin	81
<i>Methansarcinaceae</i>	AmK-dggeB2 (0-50 cm)	LrhA02 (AJ878998) Rice rhizosphere	83
	AmK-dggeB3 (0-50 cm)	A35_D28_L_A_D03 (EF552191) Anaerobic solid waste digestors	88
	AmK-dggeB11 (550-600 cm)	LW4 (DQ155311) Uncultured <i>Methanosarcina</i> sp.	86
<i>Methanomicrobiales</i>	AmK-dggeB4 (50-100 cm)	PM61 (AJ608191) Riparian flooding gradient	75
	AmK-dggeB5 (50-100 cm)	Pav-Arc-003 (DQ785299) Anoxic zone of meromictic lake Pavin	80
	AmK-dggeB6 (100-150 cm)	HC 16S (FJ977567) Zoige wetland Tian	81

Table 1. Identity of dominant DGGE bands detected by nested PCR-DGGE in sediments from the center of the Amsterdam mud volcano.

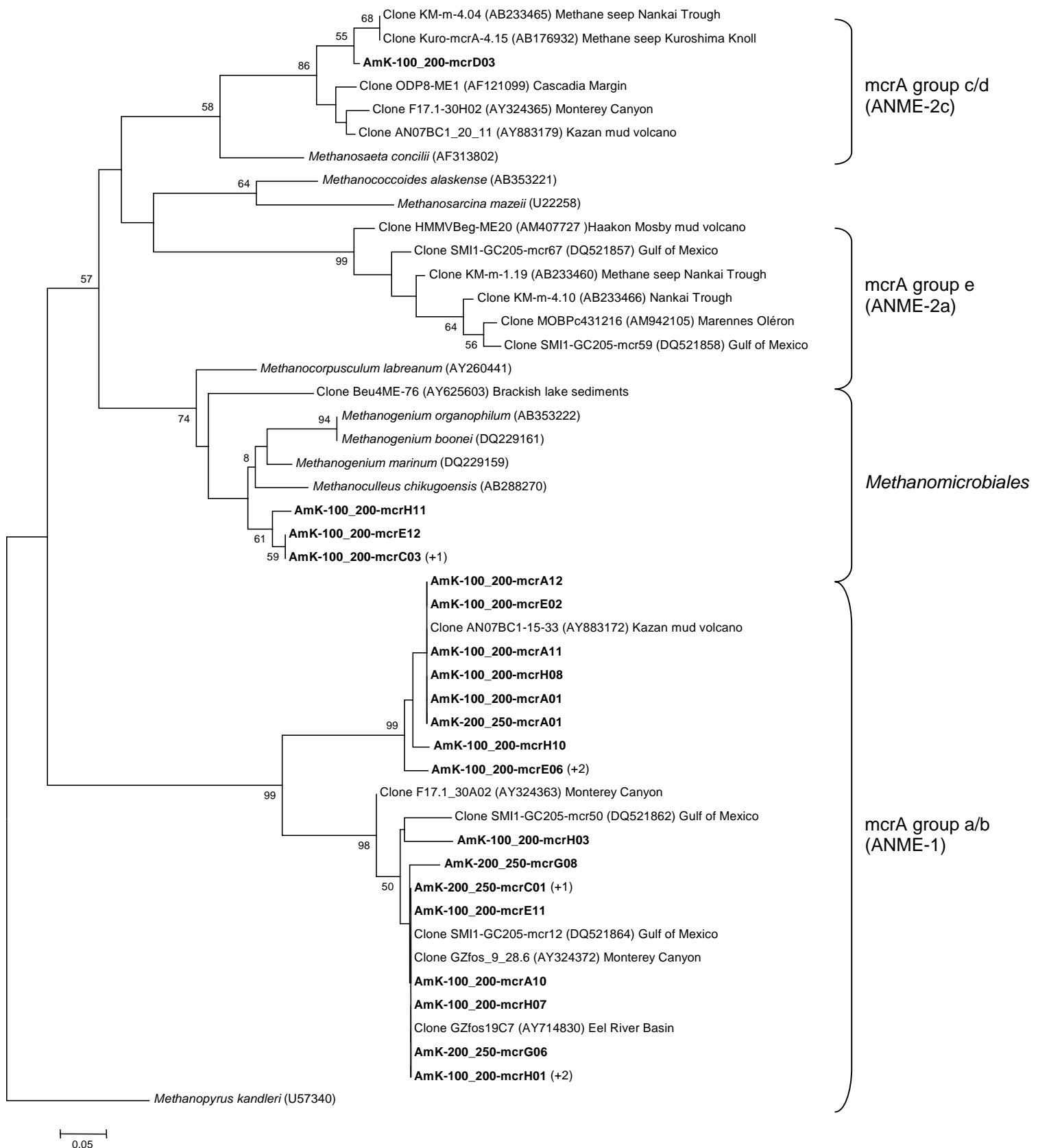


Figure 4. Distance tree showing the affiliations of Amsterdam (named AmK) MCR amino acid sequences. The tree was calculated with approximately 212 amino acids by neighbour-joining distance. Bootstrap values (in percent) are based on 1000 replicates and are indicated at nodes for branches values $\geq 50\%$ bootstrap support. Gene sequences from Amsterdam sediments are in boldface type. The bar indicates 5% estimated phylogenesis divergence.

The *mcrA* phylotypes were mainly affiliated with the ANME-1 (*mcrA* group a/b), and with the ANME-2c and the *Methanomicrobiales* of the genus *Methanogenium* in minority (Fig. 4). Only three *mcrA* gene sequences obtained from sediments collected from 100 to 200 cmbsf were affiliated with representatives cultivated methanogens.

DISCUSSION

Sediments from the center of the Amsterdam mud volcano were characterized by relatively high temperatures in deeper layers. Sulfate-reduction could take place from presumable SMTZ i.e. 0 to 50 cmbsf depth, where methane content was at a minimum. From 0 to 50 cmbsf, acetate concentrations decreased, and could support sulfate-reduction within these sediments. Molecular surveys of these sediments based on 16S rRNA and *mcrA* genes included sequences affiliated with anaerobic methanotrophic *Archaea* of the ANME-1 group, and methanogens belonging to the *Methanosarcinaceae*. In addition, enrichment cultures showed that methylotrophic methanogens related to *Methanococcoides* genus were active in 0 to 50 cmbsf sediments. This was correlated to a peak in rates of methylamine/methanol methanogenesis at 47 cmbsf. The *Methanosarcinaceae* regroups acetotrophic and/or methylotrophic methanogens (Garcia *et al.*, 2000) including one genus, *Methanosarcina*, with representative strains able to use H₂/CO₂, acetate and methyl compounds (methanol, methylamines). The members of the ANME-1 clade are probably involved in the anaerobic oxidation of methane (Knittel and Boetius, 2009), reflecting that AOM could occur at 50 cmbsf in the presumed SMTZ of the Amsterdam mud volcano.

Acetate and methylamine/methanol methanogenesis co-occurred in sediment depths 50 to 100 cmbsf. However, rate of acetate methanogenesis were 10 times higher, suggesting that acetate was the main catabolic substrate for methane synthesis. The high ascending methane flow throughout sediments of Amsterdam mud volcano could prevent downwards diffusion of sulfate from the water column (Niemann *et al.*, 2006), which in turn could suppress the activity of sulfate-reducers coupled to ANME for AOM. However others electron acceptors thermodynamically more favourable than sulfate, such as Fer and Mn could be involved in AOM process as previously reported (Raghoebarsing *et al.*, 2006; Beal *et al.*, 2009).

In the same sediments depths (50 to 100 cmbsf), ANME and methanogens belonging to the *Methanomicrobiales* co-occurred. Representative cultivated

Methanomicrobiales use hydrogen as electron donor but also formate in presence of CO₂ for methanogenesis (Garcia *et al.*, 2000). However, hydrogenotrophic methanogenesis activity from H₂/CO₂ was not detected reflecting that hydrogenotrophic methanogenesis from formate instead of H₂/CO₂ could be possible in such sediments.

In sediments between 100 and 200 cmbsf, methylamine and methanol methanogenesis were the dominant pathway, with a peak at 150 cmbsf. H₂/CO₂ methanogenesis co-occurred with a peak at the same depth of 150 cmbsf. In addition, methanogenesis from hexadecane also showed a peak in these sediments but with low rates compared to the methanogenesis rates from H₂/CO₂. Hexadecane is a long chain alkane (C₁₆H₃₄) degraded by syntrophic bacterial partner to acetate and H₂ (Zengler *et al.*, 1999). Identification of *mcrA* and 16S rRNA genes in these sediment depths could be assigned to methanotrophic ANME-1 and ANME-2c, and methanogens belonging to the *Methanogenium* genus and the *Methanosarcinales*. The representative species of the *Methanogenium* genus are hydrogenotrophs and methanogens belonging to the *Methanogenium* could account for the observed peak of H₂/CO₂ rates. Representative methanogenic species of the *Methanosarcinales* could be involved in the methylamine/methanol methanogenesis peak in these sediment layers of the Amsterdam mud volcano.

From 200 to 350 cmbsf depths, acetate methanogenesis was the dominant methanogenesis pathway with a peak at 300 cmbsf. Methanogenesis from methanol and H₂/CO₂ were measured to be 10 times lower than the acetate methanogenesis rates. Methane hydrates have been detected in the Anaximander Mountains and the Amsterdam mud volcano, reflected in our sample by the observed lack of sediment in the core liner from 200 to 350 cmbsf probably due to hydrate destabilization during core retrieval and on-deck handling. The observation of peaks in methanogenesis activities suggested that the three main nutritional categories of methanogens were stimulated at these depths as reported elsewhere from methane hydrate zones (Wellsbury *et al.*, 1997). Based on the thermal gradients, *in situ* temperatures increased in buried sediments reaching 20 to 25°C at 350 cmbsf. In heating experiments, acetate can be generated from organic matter as a result of the increasing thermal gradient (between 10 to 60°C) during sediment burial (Wellsbury *et al.*, 1997). As a consequence, increasing temperatures result in increasing pore water acetate in deeper sediments. This acetate in turn could stimulate acetoclastic

methanogenesis. Furthermore, in methane-saturated sediment, acetogenic bacteria could outcompete hydrogenotrophic methanogens for bicarbonates (Heuer *et al.*, 2009).

In sediment depths from 200 to 250 cmbsf, *mcrA* gene sequences were exclusively affiliated with the methanotrophic ANME-1 clade although methanogenesis from acetate was measured. A recurrent hypothesis is that initial step of anaerobic methane oxidation is essentially a reversal of the terminal reaction in methanogenesis (Hoehler *et al.*, 1994; Boetius *et al.*, 2000; Hallam *et al.*, 2003; Krüger *et al.*, 2003). And, very recently, a metagenomic approach supported the reverse methanogenic pathway hypothesis in ANME-1 (Meyerdierks *et al.*, 2009). Hence, the ANME could reverse AOM if enzymes can react in both directions like those involved in methanogenesis (Treude *et al.*, 2007), and could account for the acetoclastic methanogenesis rates at these depths.

Below 350 cmbsf, methane was produced exclusively from methylamines. Sequence related to *Methanosarcinales* were detected in sediments from 550 to 600 cmbsf suggesting that methanogens could be able to catalyse methylamines for methane production. Methylotrophic methanogenesis was measured throughout the sediment core, highlighting that these methanogens were able to find alternative substrates to support their growth.

ANME-1 were present in the Amsterdam mud volcano center, from the sediment-water interface down to 400 cmbsf, depth where ANME-2c occurred from 100 down to 600 cmbsf depth. The ANME-2a and 2c subgroups were mostly recovered in environments with low fluid fluxes (Mills *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2006) and high methane concentrations (Wegener *et al.*, 2008). In high flow regimes, ANME-1 could outgrow and outcompete ANME-2 for resources (Girguis *et al.*, 2005).

Some sequences obtained from sediments of the Amsterdam mud volcano belonged to the *mcrA* a/b group, and formed a distinct cluster affiliated with clones retrieved from sediments of the Kazan mud volcano (with 92 to 98 % of similarity), which is also part of the Anaximander Mountains. Environmental conditions encountered in sediments of the Amsterdam mud volcano and general in the Anaximander Mountains (i.e. high methane fluxes, high temperatures in deep sediments, presence of methane hydrates), and probably determined specific ecological niches for adapted microbial populations.

Acetate concentrations were extremely high in the sediment pore waters of the center of the Amsterdam mud volcano. It has been proposed that acetate could be generated at high temperatures in the deep biosphere by abiotic reactions (Wellsbury *et al.*, 1997). Hence, as both the temperature gradient and fluid flows were high in the active center of the surface sediments of the Amsterdam volcano (Charlou *et al.*, 2003), ascending mud and fluids, originating from deeper reservoirs, could be acetate-enriched.

In summary, archaeal methanogenic and metanotrophic populations co-occurred in sediments of the center of the Amsterdam mud volcano. Generally the methanogenic activity pathways are in agreement with the methanogenic sequences that were detected along the sediment column with depth. Acetate methanogenesis was the dominant methanogenic pathway in sediment of the Amsterdam mud volcano. High acetate concentrations could be explained by abiotic production in the deep hot reservoir of the volcano. Thus accessible surface sediments of the Amsterdam mud volcano may represent an open window to the deep subsurface biosphere.

Acknowledgements.

We would like to thank Josée Sarrazin, the chief scientists of the MEDECO cruise, the ROV team, the officers and crew of the RV *Pourquoi Pas ?* as well as the shipboard scientific community for their help at sea. We would also like to thank XXX for scientific suggestions and comments. This work was funded by the HERMES project Contract No: GOCE-CT-2005-511234-1, and by the ANR Deep Oasis.

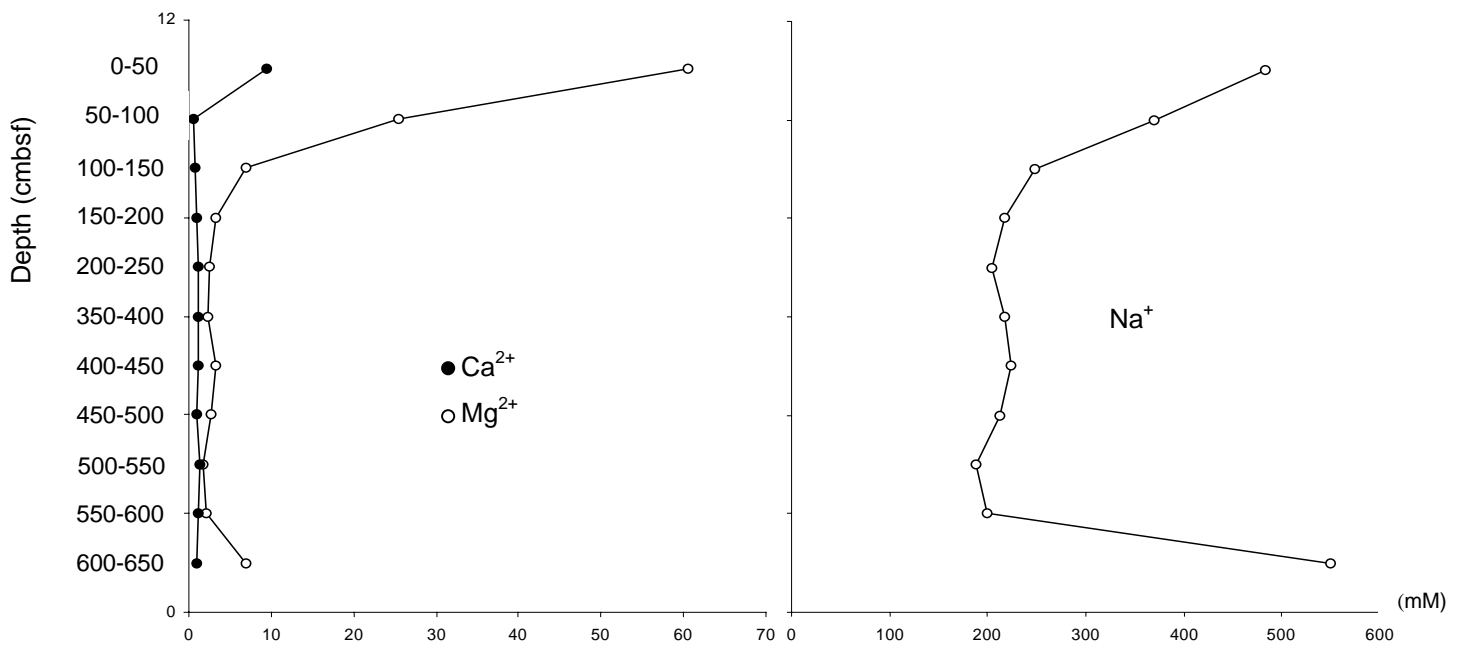
REFERENCES

- Aloisi, G., Pierre, C., Rouchy, J-M, Foucher, J-P, & Woodside, J (2000). Methane-related authigenic carbonates of eastern Mediterranean Sea mud volcanoes and their possible relation to gas hydrate destabilisation. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **184**:321-338.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Balch, W.E., and Wolfe, R.S. (1976) New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 781-791.
- Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009) Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. *Science* **325**: 184-187.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., and Gieske, A. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Borgund, A.E., and Barth, T. (1994) Generation of short-chain organic acids from crude oil by hydrous pyrolysis. *Organic Geochemistry* **21**: 943-952.
- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Baneras, L., Salio, C.P., and Muyzer, G. (2000) Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 499-508.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Zitter, T., Roy, N., Jean-Baptiste, P., Foucher, J.P. *et al.* (2003) Evidence of methane venting and geochemistry of brines on mud volcanoes of the eastern Mediterranean Sea. *Deep-sea research Part I* **50**: 941-958.
- Dählmann, A., and de Lange, G.J. (2003) Fluid-sediment interactions at Eastern Mediterranean mud volcanoes: a stable isotope study from ODP Leg 160. *Earth Planet. Sci. Lett.* **212**: 377-391.

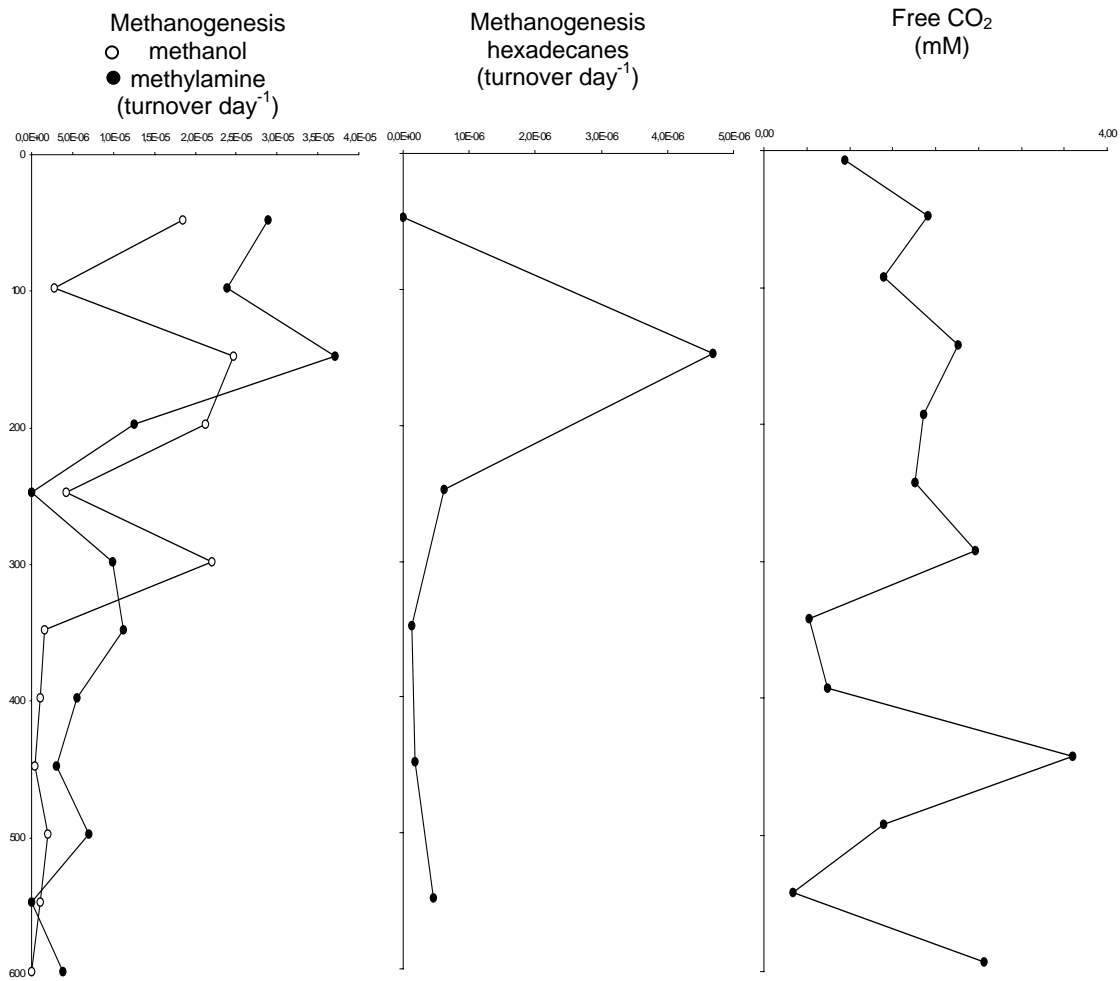
- Dhillon, A., Lever, M., Llyod, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., and Teske, A. (2005) Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the Guyamas basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4592-4601.
- Dimitrov, L., and Woodside, J. (2003) Deep sea pockmark environments in the eastern Mediterranean. *Mar. Geol.* **195**: 263-276.
- Fang, J., Shizuka, A., Kato, C., and Schouten, S. (2006) Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene and lipid analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**: 429-441.
- Garcia, J.-L., Patel, B.K.C., and Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**: 205-226.
- Girguis, P.R., E, C.A., and DeLong, E.F. (2005) Growth and Population Dynamics of Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous-Flow Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3725-3733.
- Haese, R.R., Hensen, C., and de Lange, G.J. (2006) Pore water geochemistry of eastern Mediterranean mud volcanoes: Implications for fluid transport and fluid origin. *Mar. Geol.* **225**: 191-208.
- Hales, B.A., C, E., Titchie, D.A., Hall, G., W, P.R., and R, S.J. (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 668-675.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5483-5491.
- Heijs, S.K., Laverman, A.M., Forney, L.J., Hardoim, P.R., and Dirk van Elsas, J. (2008) Comparison of deep-sea sediment microbial communities in the Eastern Mediterranean. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**: 362-377.
- Heuer, V.B., Pohlman, J.W., Torres, M.E., Elvert, M., and Hinrichs, K.-U. (2009) The stable carbon isotope biogeochemistry of acetate and other dissolved carbon species in deep seafloor sediments at the northern Cascadia Margin. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**: 3323-3336.
- Hoehler, T.M., Alperin, M.J., Albert, D.B., and Martens, C.S. (1994) Field and Laboratory Studies of Methane Oxidation in an Anoxic Marine Sediment: Evidence for a Methanogen-Sulfate Reducer Consortium *Global biogeochemical cycles* **8**: 451-463.
- Inagaki, F., Tsunogai, U., Suzuki, M., Kosaka, A., Machiyama, H., Takai, K. *et al.* (2004) Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing *pmoA*, *moxX*, *mxhF*, *mcrA*, and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7445-7455.
- Janse, I., Bok, J., and Zwart, G. (2004) A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **57**: 279-281.
- Joye, S.B., Samarkin, V.A., Orcutt, B.N., MacDonald, I.R., Hinrichs, K.-U., Elvert, M. *et al.* (2009) Metabolic variability in seafloor brines revealed by carbon and sulphur dynamics. *Nature Geoscience* **2**: 349-354.
- Kendall, M.M., and Boone, D.R. (2006) Cultivation of methanogens from shallow marine sediments at Hydrate ridge, Oregon. *Archaea* **2**: 1-8.
- Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic Archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 467-479.
- Knittel, K., and Boetius, A. (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 311-334.
- Krüger, M., Meyerdierks, A., Glöckner, F.O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M. *et al.* (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**: 878-881.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H. *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3348-3362.
- Lykousis, V., Alexandri, S., Woodside, J., de Lange, G., Dählmann, A., Perissoratis, C. *et al.* (2009) Mud volcanoes and gas hydrates in the Anaximander mountains (Eastern Mediterranean Sea). *Marine and Petroleum Geology* **26**: 854-872.
- Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glöckner, F.O., Reinhardt, R., and Amann, R. (2009) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ. Microbiol.*
- Milkov, A. (2000) Worldwide distribution of submarine mud volcanoes and associated gas hydrates. *Mar. Geol.* **167**: 29-42.
- Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., and Sobecky, P.A. (2004) Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with Beggiatoa species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5447-5458.
- Mills, H.J., Hodges, C., Wilson, K., MacDonald, I.R., and Sobecky, P.A. (2003) Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 39-52.
- Newberry, C.J., Webster, G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environ. Microbiol.* **6**: 274-287.
- Niemann, H., Lösekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K. *et al.* (2006) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**: 854-858.
- Olu-Le Roy, K., Sibuet, M., Fiala-Médioni, A., Gofas, S., Salas, C., Mariotti, A. *et al.* (2004) Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: composition, symbiosis and spatial distribution on mud volcanoes. *Deep-sea research Part I* **51**: 1915-1936.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F.L., and Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3367-3373.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A., Banning, N., Brock, F., Webster, G., Fry, J.C. *et al.* (2007) Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skaggerak, Denmark). *Environ. Microbiol.* **9**: 1146-1161.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F.W., Rijpstra, I.C. *et al.* (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**: 918-921.
- Sarradin, P.-M., and Caprais, J.C. (1996) Analysis of dissolved gases by headspace sampling, gas chromatography with columns and detectors commutation. Preliminary results. *Analytical Communications* **33**: 371-373.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L., and Whitman, W.B. (2001) Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4374-4376.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: :1596–1599.
- Thauer, R.K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Treude, T., Orphan, V., Knittel, K., Gieseke, A., House, C.H., and Boetius, A. (2007) Consumption of methane and CO₂ by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2271-2283.
- Vetriani, C., Jannasch, H.W., J, M.B., Stahl, D.A., and Reysenbach, A.-L. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4375-4384.
- Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2003) Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of microbiological methods* **55**: 155-164.
- Wegener, G., Niemann, H., Elvert, M., Hinrichs, K.-U., and Boetius, A. (2008) Assimilation of methane and inorganic carbon by microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environ. Microbiol.*
- Wellsbury, P., Goodman, K., Barth, T., Cragg, B.A., Barnes, S.P., and Parkes, R.J. (1997) Deepmarine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature Geoscience* **388**: 573-576.
- Yoshioka, H., Sakata, S., Cragg, B.A., Parkes, R.J., and Jujii, T. (2009) Microbial methane production rates in gas hydrate-bearing sediments from the eastern Nankai Trough, off central Japan. *Geochemical Journal* **43**: 315-321.
- Zengler, K., Richnow, H.H., Rossello-Mora, R., Michaelis, W., and Widdel, F. (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**: 266-269.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 316-322.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



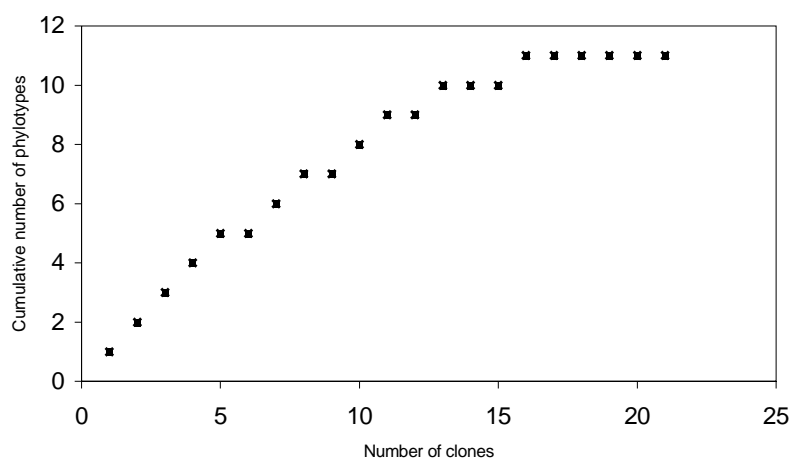
SM1. Depth profiles of the porewater concentrations of Mg²⁺, Na⁺, and Ca²⁺ in the Amsterdam mud volcano centre sediments.



SM2. Depth profiles of methanogenic activities from methylamines, methanol and hexadecane, and free CO₂ in sediments from the centre of the Amsterdam mud volcano. Methanogenesis rates are expressed in turnover/day.

Phylogenetic affiliation	Clone	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)
<i>Methanogenium</i>	AmK-100_200-mcrC03	strain DSM 3596 (AB353222) Methanogenium organophilum	85
	AmK-100_200-mcrE12	strain DSM 3596 (AB353222) <i>Methanogenium organophilum</i>	86
<i>mcrA</i> group c/d	AmK-100_200-mcrH11	strain DSM 3596 (AB353222) <i>Methanogenium organophilum</i>	85
	AmK-100_200-mcrD03	<i>Methanogenium organophilum</i> F17.1_30H02 (AY324365) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	91
<i>mcrA</i> group a/b	AmK-100_200-mcrA01	AN07BC1_15_33 (AY883172) Kazan mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	98
	AmK-100_200-mcrA10	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	AmK-100_200-mcrA11	AN07BC1_15_33 (AY883172) Kazan mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	98
	AmK-100_200-mcrA12	AN07BC1_15_33 (AY883172) Kazan mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	99
	AmK-100_200-mcrE02	AN07BC1_15_33 (AY883172) Kazan mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	98
	AmK-100_200-mcrE06	AN07BC1_15_33 (AY883172) Kazan mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	94
	AmK-100_200-mcrE11	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	AmK-100_200-mcrH01	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	AmK-100_200-mcrH03	SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864) Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico	91
	AmK-100_200-mcrH07	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	AmK-100_200-mcrH08	AN07BC1_15_33 (AY883172) Kazan mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	98
	AmK-100_200-mcrH10	AN07BC1_15_33 (AY883172) Kazan mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	98
	AmK-200_250-mcrA01	AN07BC1_15_28 (AY883169) Kazan mud volcano, Eastern Mediterranean Sea	90
	AmK-200_250-mcrC01	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	91
	AmK-200_250-mcrG06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	91
	AmK-200_250-mcrG08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	86

SM3. Closest relatives of representative clones from *mcrA* gene libraries from depths 100 to 200 (AmK-100_200), and 200 to 250 cmbsf (AmK-200_250) of the Amsterdam mud volcano.



SM4. Rarefaction analysis of the *mcrA* genes from 100 to 200 cmbsf depths, by using the RarFac program.

Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the center of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea

(in preparation)

Cassandre Sara Lazar¹, R. John Parkes², Barry A. Cragg², Stéphane L'Haridon¹, Daniel Prieur¹, and Laurent Toffin¹

¹Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, Ifremer Centre de Brest, Département Etudes des Environnements Profonds, Université de Bretagne Occidentale, BP70, 29280 Plouzané, France.

²School of Earth, Ocean and Planetary Sciences, Cardiff University, Main Building, Park Place, Cardiff CF103YE, UK.

Correspondance: Laurent Toffin, Tel.: +33(0)2 98 22 43 96, Fax. +33(0) 98 22 47 57, e-mail: Laurent.toffin@ifremer.fr.

ABSTRACT

Submarine mud volcanoes are a large source of methane to the atmosphere. The Napoli mud volcano, situated in the brine-impacted Olimpi Area, emits mainly biogenic methane particularly at the center of the mud volcano. Measures of temperature gradients support the hypothesis that Napoli is a cold mud volcano with moderate fluid flow rates. We carried out biogeochemical and molecular analysis to assess the methanogenic activity rates, pathways and diversity in the hypersaline sediments of the center of the Napoli the mud volcano. Methanogenic rates show that H₂/CO₂ is the dominant pathway in the sulfate-poor sediment layers of Napoli, and that methylotrophic methanogenesis is present at all depths of the sediment core. Acetate methanogenesis is low but measurable, pointing that acetoclastic methanogens could tolerate hypersaline environments. Molecular tools as well as enrichment cultures of methanogens show presence of *Methanococcoides* in the shallow sediment layers and in deeper layers, suggesting that methylotrophic methanogens could be adapted to saline conditions. Enrichment cultures also show presence of active *Methanomicrobiales* in the H₂/CO₂ methanogenesis dominated sediment layers. PCR-DGGE and *mcrA* clone libraries highlight presence of ANME hinting that AOM may occur in the Napoli sediments.

INTRODUCTION

Large amounts of the greenhouse gas methane are stored in marine sediments (Kvenvolden, 1988). Methane ascends from deep sources along channels or conduits reaching the seafloor, creating geological structures such as pockmarks or mud volcanoes. Submarine mud volcanoes are typically found at various tectonically active and passive continental margins, from which mud and fluids (water, brine, gas, oil) flow or erupt (Milkov, 2000). They are considered a significant source of atmospheric carbon, especially methane (Dimitrov, 2003). Despite their name recalling magmatic volcanism, mud volcanoes are typically driven by overpressured sediment in subduction zones of continental margins. They sometimes erupt violently or gently expulse semi-liquid mud-volcano breccia (Dimitrov, 2003). Over 200 mud volcanoes have been found along the northern flank of the Mediterranean Ridge in the eastern Mediterranean Sea (Charlou *et al.*, 2003). The formation of the Mediterranean Ridge is linked to the collision between the African and Eurasian tectonic plates, resulting in intensive faulting (Haese *et al.*, 2006). The Napoli mud volcano is a circular dome belonging to the Olimpi area (Fig. 1A). This mud volcano is associated with ascending brine fluids characterized by pools and lakes with diameter size ranging from centimeters to meters (Charlou *et al.*, 2003). Fauna was observed on the summit (active inner zone), whereas the outer zone hosted mostly dead animals, suggesting that chemosynthetic activity is moderate due to brines and mild fluid flows (Olu-Le Roy *et al.*, 2004).

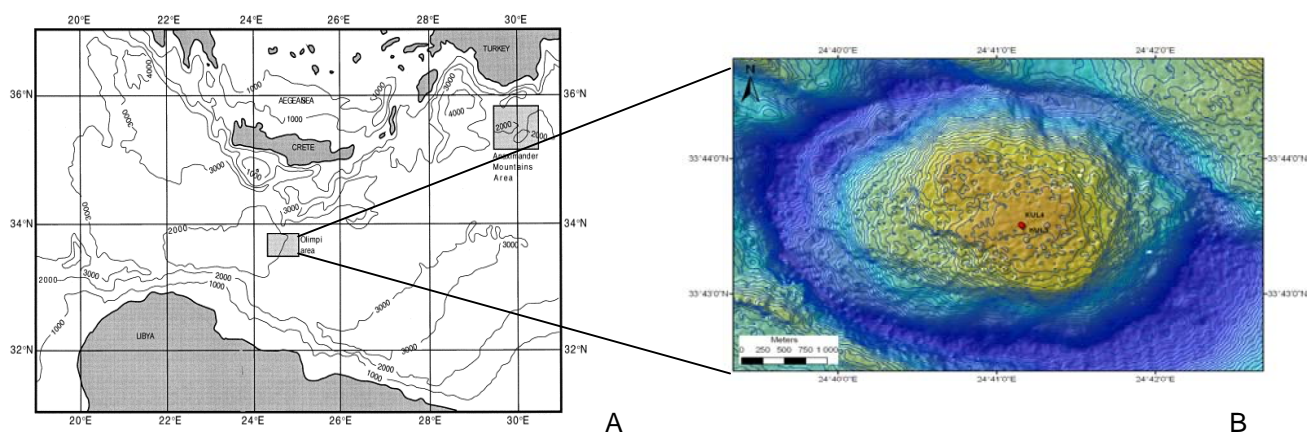


Figure 1: A) Location map showing the Olimpi area in the Eastern Mediterranean Sea. From Aloisi *et al.* (2000). B) Closer view of the Napoli mud volcano and the sampled gravity cores (Bénédicte Ritt, pers. comm.).

Most of the gas venting from these mud volcanoes is composed of methane, mainly of biogenic origin (Charlou *et al.*, 2003), and is produced by methanogenic *Archaea*. Methanogenesis is the final step in the fermentation of organic matter. Methanogens are divided into three nutritional groups based on the type of carbon sources used as catabolic substrates for methane production: hydrogenotrophs use H_2/CO_2 , acetoclasts use acetate, and methylotrophs use methylated compounds (Garcia *et al.*, 2000). Few studies have specifically focused on activity or diversity of methanogens in cold seeps and mud volcanoes (Dhillon *et al.*, 2005; Kendall & Boone, 2006; Parkes *et al.*, 2007), and few methanogens have been isolated and cultured from cold seeps. The highest fluid flows are generally located in the physical center of the mud volcanoes. However, most (>90%) of the uprising methane is consumed by anaerobic oxidation of methane (AOM) before it reaches the seafloor (Knittel & Boetius, 2009). AOM is driven by methanotrophic *Archaea* (ANME), and is sometimes coupled to sulfate reduction (SR) driven by *Desulfosarcinales*- and *Desulfobulbus*-related bacteria as sulfate-reducing partners (Boetius *et al.*, 2000; Knittel *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2006). AOM could also be coupled to additional electron acceptors such as NO_3^- (Raghoebarsing *et al.*, 2006), Fe(II) and Mn(IV) (Beal *et al.*, 2009) energetically more favourable than sulfate. Based on the 16S rRNA gene phylogeny, AOM in marine environments is mediated by three distinct clusters of *Euryarchaeota*, namely ANME-1, ANME-2 and ANME-3. These clusters are phylogenetically distantly or closely related to the orders *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* which include cultivated methanogens (Lösekann *et al.*, 2007). The ANME have not yet been obtained in pure culture, and the biochemical pathways of AOM remain unknown. Genomic approaches suggest that methane-producing *Archaea* are able to reverse the reactions of methanogenesis to produce cellular carbon and energy. The identification of most of the genes associated to methanogenesis and especially a modified methyl coenzyme M reductase (MCR) (Hallam *et al.*, 2003; Hallam *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2003), which catalyzes the final step of methanogenesis (Thauer, 1998) strongly supports this assumption. The *mcrA* gene, which encodes the MCR, is unique and found in all methanogens and anaerobic methanotrophs (Thauer, 1998). Phylogenetic *mcrA* based trees mirror the phylogeny of the 16S rRNA genes for all known methanogens (Hales *et al.*, 1996; Luton *et al.*, 2002). And, the *mcrA* genes are conserved genes making them specific

and useful functional gene markers, targeting methanogens and methanotrophs in the environment.

The maximum activity of a mud volcano is generally located at the center where methane-rich muds and fluids are freshly expelled from the deep reservoir. Hypothesis is that expelled mud in the surface sediment of the center of the Napoli mud volcano might be a window into the subsurface biosphere. In Napoli, methane to ethane ratios and $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ values (-65.6‰PDB) indicate that methane is microbially produced via methanogenesis. The Napoli mud volcano is affected by brine fluids from deep reservoirs (Charlou *et al.*, 2003), that probably impact on the geochemistry and thereby the microbial diversity and activities. However, the methanogenic communities diversity in active centers of mud volcanoes is not thoroughly characterized to date. Hence, in this study pathways for biogenic methane production, community structure and activities of methanogens in the center of the Napoli mud volcano were assessed. Thereby, three main trophic groups of methanogenesis activity rates were measured. Vertical distribution of *Archaea*, including methanogens were monitored by using PCR-DGGE based on the 16S rRNA genes, as well as construction of *mcrA* gene libraries.

MATERIALS AND METHODS

Site description and sediment sampling.

Sediment cores were collected from the Eastern Mediterranean Sea, in the Olimpi area, during the Ifremer MEDECO cruise with the research vessel Pourquoi Pas? in October/November 2007. Two gravity cores KUL-3 (33°43.497'N, 24°41.1648'E) and KUL-4 (33°43.508'N, 24°41.1549'E) measuring 160 cm and 120 cm respectively were recovered from the center of the Napoli mud volcano at 1940 metres of water depth (Fig. 1B). Temperature gradients were measured using sensors attached to the gravity cores. Immediately after retrieval, the KUL-3 and KUL-4 cores were sectioned aseptically in 20-cm-thick layers in the cooling room (4°C), and mini-cores of sediment were removed for gas and molecular analysis. Samples for molecular analysis were collected by using cut-off sterile 5 mL syringes in the 20 cm sediment sections of KUL-4 and were frozen at -80°C for nucleic acid extractions. The KUL-3 20 cm sections were flushed with nitrogen, hermetically sealed in aluminium bag-rolls (Grüber-Folien, Germany), and transported to the laboratory at 4°C for subsequent methanogenesis rate measurements and pore water analysis.

Biochemistry.

Porewater was obtained by centrifuging approximately 10 g of crude sediment for 15 minutes at 3000 x g at 4°C. The porewater was then stored at -20° until required. Depth distribution of dissolved cations were quantified from diluted porewater using standard ion chromatographic techniques. Cation concentrations were measured using ion exchange chromatography, with a isocratic DX120 ion chromatography system (DIONEX Corporation, Sunnyvale, CA) fitted with Ionpac CS 12A columns and a suppressor (CSRS-ultra II) unit in combination with a DS4-1 heated conductivity cell. Components were separated using a methanesulfonic acid (18mM) gradient, with a flow of 1 ml min⁻¹.

Pore water sulfate and acetate concentrations were measured by ion exchange chromatography using an ICS-2000 ion chromatography system (Dionex®, UK) fitted with two AS15-HC 4 mm columns in series, and a Dionex® Anion Self-Regenerating Suppressor (ASRS®-ULTRA II 4-mm) unit in combination with a Dionex® DS6 heated conductivity cell. Components were separated using a potassium hydroxide gradient program as follows: 6.0 mM KOH (38 min isocratic), 16.0 mM KOH min⁻¹ to 70 mM (17 min isocratic).

Methane concentrations were measured on board using the headspace technique coupled with a gas chromatograph GC (HSS-GC) equipped with a thermal-conductivity detector (TCD) and a flame-ionisation detector (error of 4%) (details in Sarradin & Caprais, 1996).

Methanogenesis rate measurements.

Whole round cores for measurements of methanogenesis activity rates were taken every 20 cm and were stored under nitrogen in aluminium bags in a cold room at 4°C until being further processed (three months). Radiotracer experiments using ¹⁴C labelled substrates were conducted in the laboratory at Cardiff University, UK. Intact 5 mL syringe subcores were taken in the center of core, and sealed with sterile Suba Seals and stored in N₂ prior to injection with isotopes. The 5 mL syringes were injected with radiotracers ([¹⁴C]bicarbonate, [¹⁴C]acetate, [¹⁴C]methanol [¹⁴C]methylamine or [¹⁴C]hexadecane and incubated at close to *in situ* temperatures (15°C). Activity was then stopped by freezing before processing in the laboratory. Methane production rates were calculated based on the proportion of labelled gas produced from the ¹⁴C-substrate, the dissolved porewater acetate adjusted for

sediment porosity and incubation time. Because incubation conditions were not identical to conditions in the original sediment, measured rates might differ from those *in situ*.

Acridine Orange Direct Counts

Total prokaryote numbers were determined by AODC counts as previously described (Parkes *et al.*, 2005). Trends and peaks in rate and AODC data were assessed by analysis of variance, the sum of squares simultaneous test procedure and the Moodmedian test, as appropriate by Mini-Tab 14.2.

Culture media for enrichment of methanogens.

Enrichment were performed anaerobically in 50 mL vials according to Balch & Wolfe (1976). Medium 141 from the DSMZ were used with slight modifications : organic substrates were omitted except yeast extract with a concentration adjusted to 0.2 g L⁻¹. The medium was prepared and sterilized under 80 % N₂ and 20 % CO₂ gas atmosphere. In order to enrich CO₂-reducing, acetoclastic and methylotrophic methanogens, three enrichment media supplemented with H₂ (200 kPa), acetate (10 mM), trimethylamine (TMA, 20 mM) were used. 1 g of sediment from the different sections of the KUL-4 core were inoculated into 9 mL of medium (pH 7), the suspension was mixed and serially diluted until 10⁻³. The cultures were incubated at 15°C to mimic *in situ* conditions. Cultures were periodically checked for methane production for one year. The methane detection was performed directly in the headspace of vial cultures by a micro MTI M200 Gas Chromatograph equipped with MS-5A capillary column and Poraplot U capillary column. Positive enrichment dilutions of methanogens were monitored by PCR-DGGE. For dilutions showing one DGGE band on the fingerprint, 16S rRNA genes were amplified using the A8F and A1492R primers, cloned and sequenced as mentioned hereafter.

DNA extraction and purification.

Total genomic DNA was directly extracted and purified from 5 g of wet sediment for all 20-cm-thick sections in duplicates, by using the Zhou *et al.* (1996) method with modifications. Sediment samples were mixed with DNA extraction buffer as described by Zhou *et al.*, and then frozen in liquid N₂ then thawed at a 65°C, 3 times.

The pellet of crude nucleic acids obtained after centrifugation, was washed with cold 80% ethanol, and resuspended in sterile deionized water, to give a final volume of 100 μ L. Crude DNA extracts were then purified using the Wizard DNA clean-up kit (Promega, Madison, WI). DNA extracts were aliquoted and stored at -20°C until required for PCR amplification.

PCR-DGGE amplification of total DNA.

Archaeal 16S rRNA genes were amplified by PCR from purified DNA extracts using the Archaeal targeted primers pair 8F (5'-CGGTTGATCCTGCCGGA-3') and 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Casamayor *et al.*, 2000). All PCR reactions (total volume reaction 25 μ L) contained 1 μ L purified DNA template (1/25 dilution), 1 X PCR buffer (Promega, Madison, WI), 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer (Eurogentec) and 0.6 U *GoTaq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI). Amplification was carried out using the GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 49°C for 1 min 30 s, and extension at 72°C for 2 min for 30 cycles. All the archaeal 16S rRNA gene PCR products were then re-amplified with primers 340F (5'-CCCTACGGGGYGCASCAG-3') (Vetriani *et al.*, 1999) containing a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3') at the 5' end and 519R (5'-TTACCGCGGCKGCTG-3') (Ovreas *et al.*, 1997). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 72°C to 62°C (touchdown $-0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{cycle}^{-1}$) for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 20 cycles, then denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 10 cycles, final extension at 72°C for 30 min (Janse *et al.*, 2004).

To restrict contamination to a minimum, PCR experiments was carried out under aseptic conditions (Captair® bio, Erlab, Fisher Bioblock Scientific) using autoclaved and UV-treated plasticware and pipettes, and only sterile nuclease-free molecular grade water (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Positive (DNA extracted from pure cultures) and negative (molecular grade water) controls were used in all PCR amplifications.

DGGE fingerprinting analysis, band excision and sequencing.

DGGE was carried out as described by Webster *et al.* (2003) with some modifications. PCR products were separated by DGGE using the D-Gene™ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) on 8% (w/v) polyacrylamide gels (40% acrylamide/bis solution 37.5:1 Bio-Rad) with a gradient of denaturant between 20% and 60%. A denaturing gradient gel consists of [100% denaturant equals 7M urea and 40% (v/v) formamide]. Gels were poured with the aid of a 30 mL volume Gradient Mixer (Hoefer SG30, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and prepared with 1 X TAE buffer (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Electrophoresis was carried out at 60°C, 200 V for 5 hours (with an initial electrophoresis for 10 min at 80 V) in 1 X TAE buffer. Polyacrylamid gels were stained with SYBRGold nucleic acid gel stain (Invitrogen, San Diego, CA) for 30 min, and viewed using the Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Individual DGGE bands of interest were excised and washed in sterile-nuclease free molecular grade water for 10 min. Bands were then air-dried and crushed in 10-20 µL molecular grade water and incubated overnight at 4°C. The supernatent (1µL) was used as template DNA in a nested PCR using primer set 340F and 519R. The PCR products of excised DGGE bands were sequenced with primer 519R, using an ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the OUEST-Genopôle plateforme of Roscoff Marine laboratory (France).

***mcrA* PCR amplification, and cloning.**

Genes coding for the alpha subunit of the methyl- coenzyme M-reductase's (*mcrA*) were amplified using the ME1 (5'-GCMATGCARATHGGWATGTC-3') and ME2 (5'-TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT-3') primers (Hales *et al.*, 1996). The PCR conditions were as follows : denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 50°C for 1 min 30 s, and extension at 72°C for 3 min for 30 cycles. PCR products were purified with the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and analyzed on 1% (w/v) agarose gels run in 1 X TAE buffer stained with ethidium bromide and then UV-illuminated. Purified PCR products were cloned into TOPO® XL PCR Cloning Kit, and transformed into *Escherichia coli* TOP10 One Shot® cells (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations.

DNA sequencing and phylogenetic analysis.

16S rRNA and *mcrA* gene sequences were obtained using BigDye terminator chemistry and determined on a ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer automated capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cloned 16S rDNA and *mcrA* gene fragments were sequenced using the M13 reverse primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') universal primer and analyzed using the NCBI BLASTN search program within GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul *et al.*, 1990). The presence of chimeric sequences in the clone libraries was determined with the CHIMERA CHECK program of the Ribosomal Database Project II (Center for Microbial Ecology, Michigan State University, <http://wdcml.nig.ac.jp/RDP/html/analyses.html>). Potential chimeras were eliminated before phylogenetic trees were constructed. The *mcrA* sequences were then edited in the BioEdit v7.0.5 program (Hall, 1999), translated into amino acid sequences, and aligned using ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). Sequence data was analysed with the MEGA4.0.2 program (Tamura *et al.*, 2007). The phylogenetic trees were calculated by the neighbour-joining analysis. The robustness of inferred topology was tested by bootstrap resampling (1000).

Rarefaction curves were calculated for each *mcrA* clone library using the RarFac program (<http://www.icbm.de/pmbio/>), and we used a 95% similarity level to define the groups of sequences. Libraries' coverage was calculated using the following formula: $C = [1 - (n_1/N)] * 100$, where n_1 is the number of unique OTUs, and N is number of clones in the library (Singleton *et al.*, 2001).

Nucleotide sequence accession numbers.

The sequence data reported here will appear in GenBank nucleotide sequence databases under the accession no. XXX to XXX for *mcrA* genes and XXX to XXX for DGGE bands. Sequences obtained from enrichments are no. XXX to XXX.

RESULTS

Impact of deep brine incursions to geochemistry of the center of the Napoli mud volcano sediments.

Temperature gradients measured on both KUL-3 and KUL-4 gravity cores in the center of Napoli indicate an average temperature of 14°C throughout the sediment cores, with a gradient of 100°C/km (Jean-Paul Foucher, pers. comm.). This value

remains low compared for ewample to high gradients of mud volcanoes of the Nile Deep-Sea Fan, indicating that Napoli is a cold mud volcano with moderate fluid flow rates and activities. Chloride measurements show a clear increase with depth (Fig. 2), from 1578 mM in surface sediments (3 times higher than seawater), to 5085 mM at the deepest (120 cmbsf) sediment layers (10 times higher than seawater). The observation of brine accumulations as shallow pools on Napoli reflect brine rivers. Compared to normal Mediterranean seawater, in the Napoli sediment porewater Cl^- and Na^+ are enriched, whereas Mg^{2+} , K^+ (data not shown), Ca^{2+} , and SO_4^{2-} are depleted as previously reported (Charlou *et al.*, 2003). Profiles of the Mg^{2+} and Ca^{2+} porewater concentrations (*Supplementary material. SM1*) show decrease with depth indicating authigenic carbonate precipitation in layers between 0 and 60 cmbsf. Indeed, anaerobic oxidation of methane (AOM) increases alkalinity in porewater fluids by producing HCO_3^- , that in turn reacts with the Mg^{2+} and Ca^{2+} cations. The Na^+ porewater concentrations profile (*Supplementary material. SM1*) show increase with depth, and is clearly correlated with the Cl^- profile.

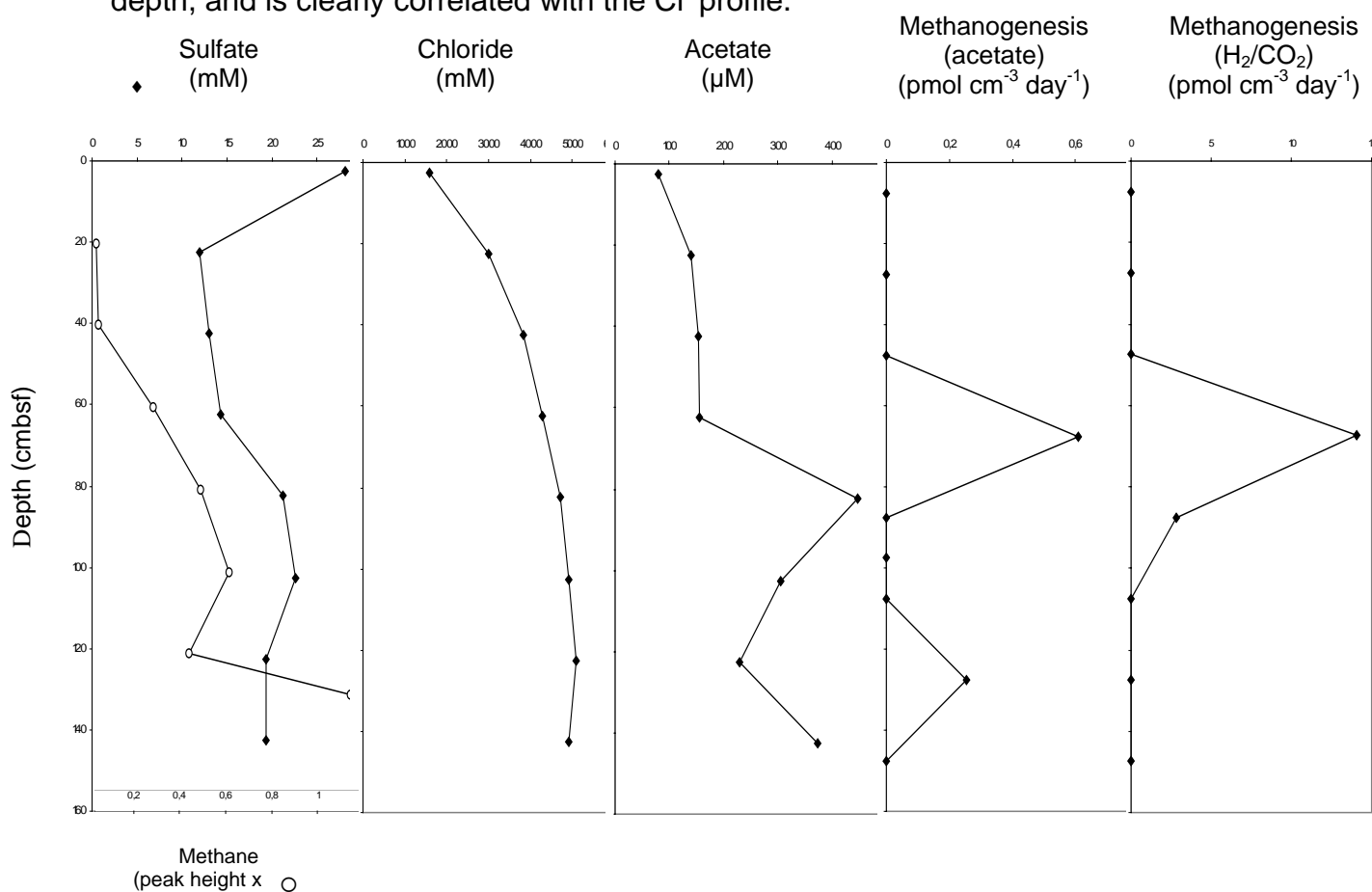


Figure 2: Depth profiles of geochemistry and methanogenic activities in the Napoli mud volcano center sediments.

Sulfate was present both in the near surface, originating from the seawater, and at depth indicating that the center of the Napoli mud volcano is influenced by a deep brine incursion. Sulfate concentrations in porewater decreased, highlighting probable sulfate reduction as previously suggested (Heijs *et al.*, 2008), until 22 cmbsf where it reaches 12 mM. Below 22 cmbsf, the sulfate porewater profile does not reach depletion (Fig. 2). It has been shown that various electron acceptors, such as sulfate diffuse upwards from deep brines (D'Hondt *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2005). Hence the irregular aspect of the sulfate profile could be explained by a mixing of sulfate sediment porewater with sulfate-rich brine fluids diffusing upwards.

Methane was present in Napoli sediments from 60 to 130 cmbsf with a peak occurring at 130 cmbsf, while the porewater sulfate concentrations never reached zero but showed a substantial reduction between 0 and 20 cmbsf (Fig. 2). It is tempting to assume that the sulfate to methane transition zone (SMTZ) might be situated between 20 and 40 cmbsf.

Acetate porewater concentrations were high and overall increased with depth, with 80 μM in the shallow sediments (Fig. 2). Maximum acetate concentration was measured at 85 cmbsf (448 μM), and corresponded to a peak in acetate methanogenesis rates. Surprisingly, acetate concentrations range (80-448 μM) was high compared to seep and non-seep sediments (Newberry *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2007), but also compared to acetate concentrations in sediments of a brine impacted mud volcano in the Gulf of Mexico (maximum 60 μM , Joye *et al.*, 2009).

Concentrations of dissolved inorganic carbon (free CO_2) increased with depth to reach a maximum of 8.77 mM at 60 cmbsf probably stimulating rates of hydrogenotrophic methanogenesis and then returned to average concentrations as found in the shallow sediments (*Supplementary material. SM2*).

Methanogenic activities.

Turnover methanogenic activity using methylamine was the only detected pathway (*Supplementary material. SM2*) in the shallow sediment layers (0 to 40 cmbsf) where sulfate concentrations were maximum. Methylamine methanogenesis turnovers were more than 10^2 times higher than methanol methanogenesis in these same layers. Methanol methanogenesis turnovers were generally very low but a second peak of methanol methanogenesis turnover was measured at 90 cmbsf, below the presumed STMZ and methane-rich layers.

The hydrogenotrophic and acetoclastic methanogenesis activity rates were measured below the presumed SMTZ and were generally low. H_2/CO_2 methanogenesis was the dominant methane formation pathway below 50 cmbsf (Fig. 2). Rates of hydrogenotrophic methanogenesis was 25 times higher ($14 \text{ pmol cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$) than acetoclastic methanogenesis in the same sediment depth (70 cmbsf). Low rates of acetate methanogenesis followed the same trend with a peak at 70 cmbsf ($0.6 \text{ pmol cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$), and another peak ($0.25 \text{ pmol cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$) of activity was observed at 125 cmbsf. This similar depth distribution of hydrogenotrophic and acetoclastic methanogenesis was previously reported in two brines from the northern Gulf of Mexico continental slope (Joye *et al.*, 2009). Acetate methanogenesis rates in the Napoli mud volcano were in agreement with methanogenesis rates measured in sediments of the Nankai Trough (maximum rate $0.11 \text{ pmol cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$) (Newberry *et al.*, 2004). Interestingly, H_2/CO_2 methanogenesis rates are below the usual methane seeps or non-seeps ranges (Newberry *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2007). Hexadecane methanogenesis turnover suggests that methane production could be derived from saturated hydrocarbons as reported elsewhere in stable anaerobic enrichments (Zengler *et al.*, 1999). A syntrophic association involving methanogens and bacteria to degrade hexadecane to methane cannot be excluded (Dolfing *et al.*, 2008). Hence, the Napoli mud volcano might be a petroleum rich environment fuelled by deep oily source.

Culturable methanogenic diversity.

Methane production was detected in media designed to enrich methylotrophic and hydrogenotrophic methanogens (TMA and H_2/CO_2). Culturable methanogens were present in the 0-20 and 80-100 cmbsf sediment sections. Microscopic observations of positive enrichments from the TMA medium suggest that methanogens were irregular cocci, and from the H_2 medium regular cocci. Under UV light, autofluorescent methanogens were detected as free cells.

Total DNA was extracted from 10^{-1} and 10^{-2} dilution series of the TMA enriched medium of the 0-20 cmbsf section. Phylogenetic affiliation of clones NapK-0_20-enr35, and NapK-0_20-enr36 showed 99 % sequence similarity with clone Tommo05_1274_3_Arch90 of the *Euryarchaeota* (FM179838) recovered from the Tommeliten methane seep, in the North Sea (Wegener *et al.*, 2008), and respectively 97 % and 98 % of sequence similarity with the closest cultured methanogen

Methanococcoides methylutens (M59127). Clone NapK-80_100-enr37 obtained from the 10^{-1} dilution series of the TMA enriched medium of the 80-100 cmbsf section showed 99 % sequence similarity with *Methanococcoides methylutens* (FJ477324). Finally clone Napk-0_20-enr74 was obtained from the 10^{-2} dilution series of the H_2 enriched medium at the 80-100 cmbsf section. Phylogenetic affiliation of clone Napk-0_20-enr74 showed 95 % sequence similarity with *Methanogenium marinum* (NR_028225).

Prokaryotic biomass, diversity and depth distribution.

Total prokaryotic cell numbers (Fig. 3) and percentage of dividing and divided cells were relatively low in the shallow sediments ($1.49 \times 10^8 \text{ cm}^{-3}$ and 11% respectively), as shown by the general regression line. Microbial abundance strongly decreased with depth, reaching $5.5 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ at 150 cmbsf. Low bacterial populations in deeper sections coincided with a strong increase in chloride concentrations, thereby the upflowing hypersaline fluids. High concentrations of salts (Cl, Na) is lethal for non halophilic or halotolerant bacteria. Hence these hypersaline conditions within the Napoli sediments could have inhibited a significant portion of the bacterial population.

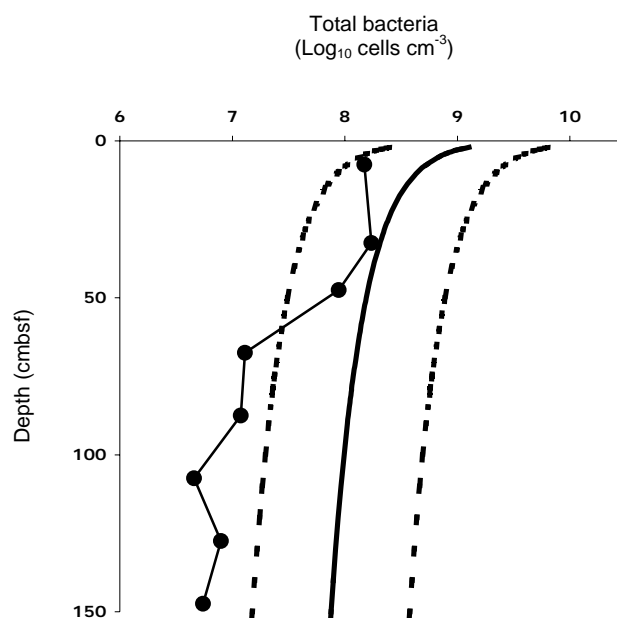


Figure 3: Depth profile of total prokaryotic cells in the Napoli mud volcano center sediments. The black line represents a general regression equation based on total prokaryotic cell counts from diverse marine sediments, with upper and lower prediction limits (95 %) shown by dashed lines, from Parkes *et al.* (2000).

The DGGE fingerprints based on 16S rRNA genes (Fig. 4) generated from DNA samples extracted directly from sediment layers associated with the center of the Napoli mud volcano displayed 11 single major bands from 0 to 120 cmbsf depth. This highlights a very low archaeal diversity in these sediments. Sections 40-60 and 100-120 cmbsf seem to contain no bands, or very weak ones. As we successfully amplified *mcrA* genes from these two sections, it is possible that the 16S archaeal primers that we used did not cover all methanogenic or methanotrophic sequences within the Napoli sediments, as mentioned elsewhere (Newberry *et al.*, 2004).

Band sequences NapK-dggeB1 to B3, and B5, B6 were affiliated to the methanotrophic ANME-1 group (with 96 to 99% of similarity) in top sections 0-20 and 20-40 cmbsf (Table 1). Band sequences NapK-dggeB7 and B8 were affiliated with the ANME-2 with 98 % of similarity, and NapK-dggeB9 with the ANME-3 with 98 % of similarity in the 60-80 cmbsf section. Finally 2 band sequences Napk-dggeB4 at 0-20 cmbsf and B10 at 80-100 cmbsf were affiliated with clones of the Marine Benthic Group D (MBG-D) with 100 and 98 % of similarity, found in hypersaline sediments of the Gulf of Mexico (Lloyd *et al.*, 2006).

According to observed peaks in methanogenic activity rates (Fig. 2 and SM2), clone libraries of the *mcrA* genes were constructed for the depth sections 40-60, 60-80, and 100-120 cmbsf. A total of 42 *mcrA* sequences from sediment depths 40 to 60 cmbsf, 29 from depths 60 to 80 cmbsf, and 40 from depths 100 to 120 cmbsf were analyzed. Rarefaction curves generated for *mcrA* clones obtained from the 3 sections indicated saturation (*Supplementary material. SM3*), while percent coverage were determined to be 87,2 %, 72,7 % and 71 % for 40-60, 60-80 and 100-120 cmbsf clone libraries respectively. The *mcrA* phylotypes present at layers 40 to 60 and 100 to 120 cmbsf were mainly affiliated with the ANME-1 (*mcrA* group a/b, Fig. 5). Some sequences were also closely related the ANME-2a (*mcrA* group e) and with methylotrophic methanogens of the *Methanococcoides* (*Supplementary material. SM4*). In the 60 to 80 cmbsf, all *mcrA* gene sequences were affiliated with the ANME-1 cluster probably involved in anaerobic oxidation of methane (Fig. 5).

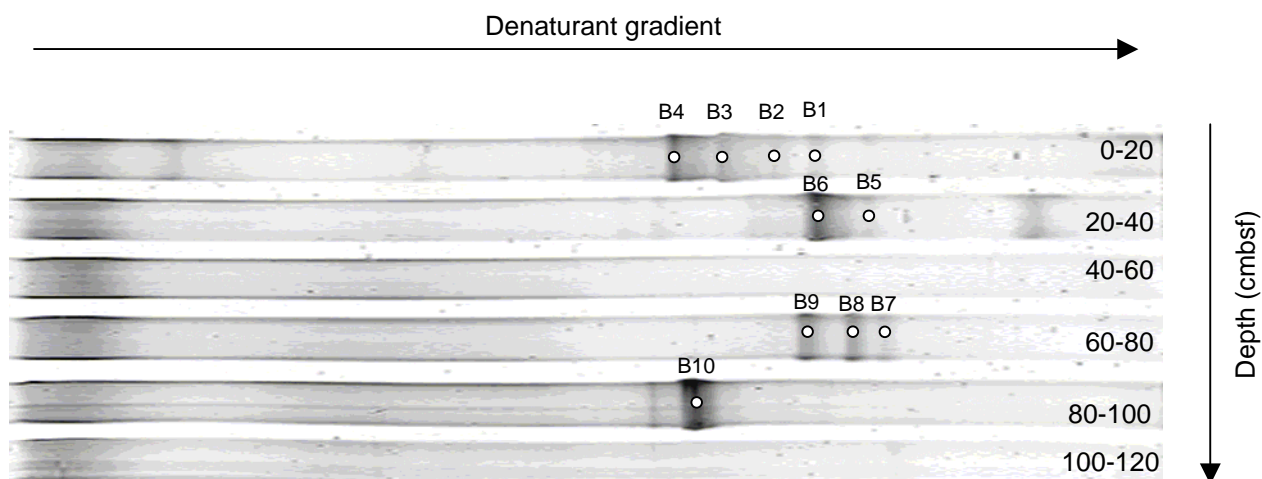


Figure 4: DGGE analysis of archaeal 16S rRNA gene sequences from various sediment depths of the Napoli mud volcano. Numbers B1 to B10 (white dots) are bands corresponding to NapK-dggeB1 to NapK-dggeB10, excised from the gel.

Phylogenetic affiliation	DGGE band	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)
MBG-D	NapK-dggeB4 (0-20 cmbsf)	SMI1-GC205-Arc25 (DQ521770) Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico	100
	NapK-dggeB10 (80-100 cmbsf)	SMI1-GC205-Arc38 (DQ521781) Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico	98
ANME-1	NapK-dggeB1 (0-20 cmbsf)	V.8.ArB20 (AY367348) Seawater and Sediments of the Cascadia Margin	98
	NapK-dggeB2 (0-20 cmbsf)	SMI2-GC205-Arc61 (DQ521758) Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico	99
	NapK-dggeB3 (0-20 cmbsf)	A163B12 (FJ455954) SMTZ, Santa Barbara Basin, California	97
ANME-2	NapK-dggeB5 (20-40 cmbsf)	BA1b1 (AF134382) Eel River Basin, Northern California	98
	NapK-dggeB6 (20-40 cmbsf)	V.8.ArB20 (AY367348) Seawater and Sediments of the Cascadia Margin	96
	NapK-dggeB7 (60-80 cmbsf)	Kazan-3A-05 (AY592029) Kazan Mud Volcano, Mediterranean Sea	98
ANME-3	NapK-dggeB8 (60-80 cmbsf)	a149 (FM179915) Gulfaks and Tommeliten Methane Seeps, Northern North Sea	98
	NapK-dggeB9 (60-80 cmbsf)	R45_1d_E12 (EU084525) Sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California	98

Table 1. Identity of dominant DGGE excised bands detected by nested PCR-DGGE in the Napoli center sediments.

DISCUSSION

Methanogenic activities and diversity with depth.

Sediments (down to 120 cmbsf depth) of the Napoli mud volcano center were characterized by very high chloride concentrations (from 1.5 M to 5 M) increasing with depth, low stable temperatures, and presumably moderate fluid flows. The center of the Napoli mud volcano contained significant numbers of prokaryotic cells in the shallow sediment. However, microbial abundance decreased with depth and were lower than the global trend of total prokaryotic distributions from other marine sediments (Parkes *et al.*, 2000). Ascendant brine-enriched fluids might affect bacterial biomass and activities and lead to cell lysis because of high osmotic stress. Although microbial abundance decreased with increasing chloride concentrations, methanogenic activities in the centre of Napoli mud volcano were comparable to those measured in subsurface sediments (Webster *et al.*, 2008), but lower than rates of methanogenesis in Mediterranean brines and Gulf of Mexico (Joye *et al.*, 1999; van der Wielen *et al.*, 2005; Daffonchio *et al.*, 2006;). This could be linked to the ascending fluid flows in the center of the mud volcano, that could hinder efficient methanogenesis.

Few *mcrA* genes of known cultivated methanogens were detected. Indeed, culturable methylotrophic methanogens closely related to *Methanococoides methylutens* were obtained from the shallow (0-20 cmbsf) and deeper (80-100 cmbsf) sediment layers, suggesting that such methanogens are present and alive in the hypersaline sediments of the Napoli mud volcano and probably participate to methane production. Culture-independent techniques were successful to identify methylotrophic methanogens belonging to *Methanococoides* from 40 to 120 cmbsf. The dominance of *Methanococoides*-type methanogens with depth in sediments of Skan Bay (Kendall *et al.*, 2007) and in anaerobic sediments of mangroves (Lyimo *et al.*, 2000; Lyimo *et al.*, 2009) have been previously reported. In both cases, methylotrophic methanogenesis was linked to the presence of methylated compounds in all sediment layers. Moreover, methanogens using non competitive substrates such as methylamines show higher tolerances to high salinity (Oren, 1999).

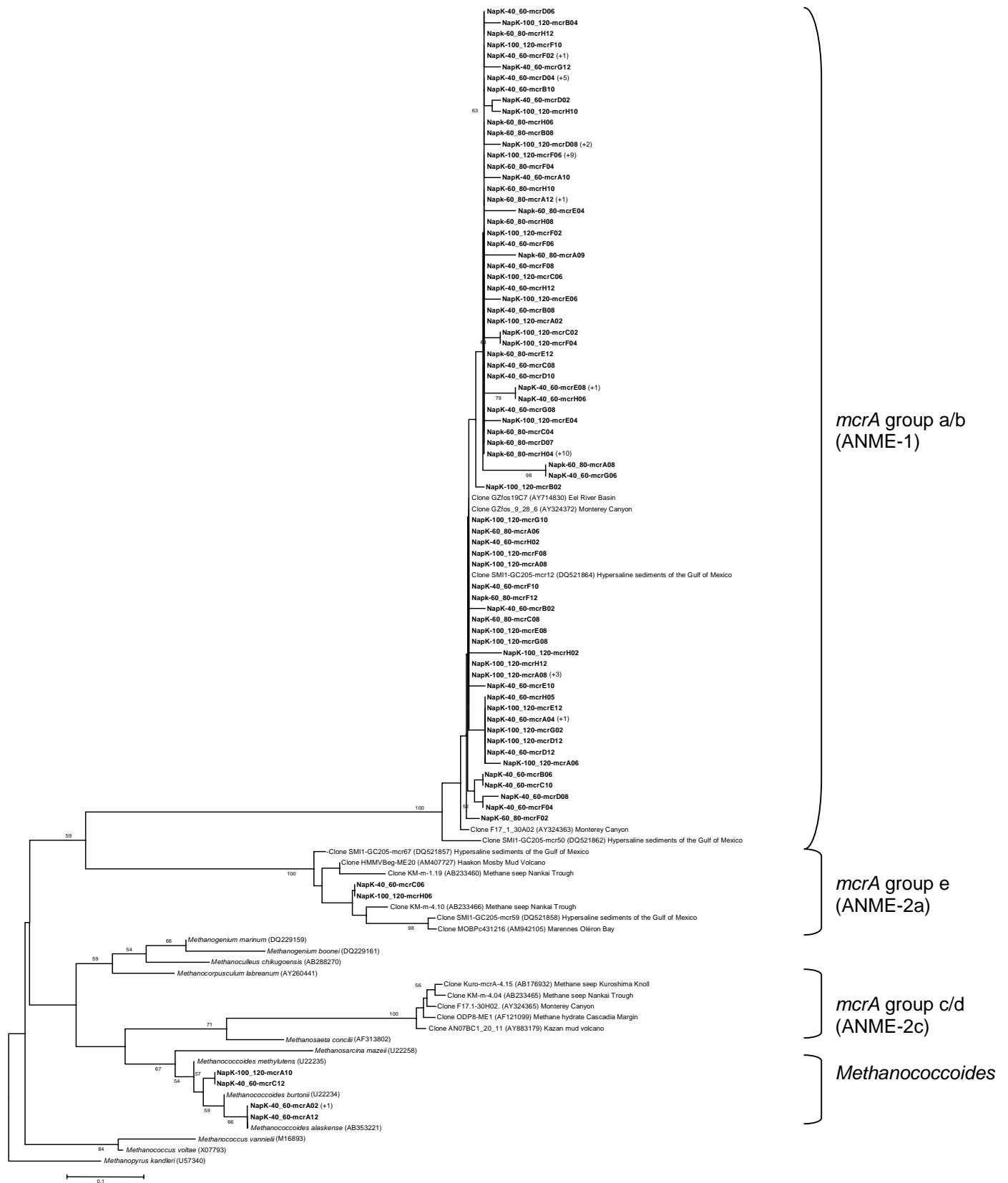


Figure 5: Distance tree showing the affiliations of Napoli (named NapK) MCR amino acid sequences. The tree was calculated with approximately 212 amino acids by neighbour-joining distance. Bootstrap values (in percent) are based on 1000 replicates and are indicated at nodes for branches values $\geq 50\%$ bootstrap support. Gene sequences from Napoli sediments are in boldface type. The bar indicates 5% estimated phylogenesis divergence.

The closest cultivated methanogen was *Methanococcoides alaskense*, a psychrophilic strain isolated from Skan Bay in Alaska, with an optimum temperature for growth at 23°C (Singh *et al.*, 2005). *M. alaskense* was also detected in a cold perennial spring of the Canadian high Arctic (Perreault *et al.*, 2007). Thus it seems that methylotrophic methanogens of the *Methanococcoides* grow in the low temperatures and high salinities sediments of the Napoli mud volcano.

In the shallow sulfate-rich sediment layers (0 to 20 cmbsf) methanogenesis rates based on methylamines were high in these layers, and methanol methanogenesis was also measured. Enrichment cultures detected methanogens belonging to *Methanococcoides methylutens*, an obligate methylotroph using only methanol and methylamines as substrates (Garcia *et al.*, 2000). The SRB outcompete methanogens for substrates such as H₂ and acetate in sulfate reducing sediments (Holmer & Kristensen, 1994). However SRB do not compete for methylated substrates that are known to be mostly available near sediment surfaces (Cetecioglu *et al.*, 2009). This is why it is not unusual to find methylotrophic methanogens in sulfate-rich marine sediments (Purdy *et al.*, 2003; Dhillon *et al.*, 2005; Roussel *et al.*, 2009).

In sediment layers of 40 to 100 cmbsf depth, methanogenesis activities including hydrogenotroph, acetotroph, and methylotroph, were measured, as well as methane formation using hexadecane. H₂/CO₂ methanogenesis was the dominant methane formation pathway, followed by acetate methanogenesis. Regarding competition with the SRB for substrates, it is not surprising to find H₂/CO₂ methanogenesis in the methane-rich sediment layers. Overall, PCR-DGGE and *mcrA* gene analysis demonstrated the presence of ANME-1, 2 and 3 clusters in sediments where H₂/CO₂, acetate and hexadecane methanogenesis rates were measured, suggesting that AOM is probably present and active. CO₂ produced by anaerobic methane oxidation mediated by ANME could be available for the hydrogenotrophic methanogenesis thus enhancing methane production (Parkes *et al.*, 2007). Furthermore, H₂ could be supplied by sulfate reduction process that presumably occurs in the overlying sediments (Zepp Falz *et al.*, 1999). Moreover, hexadecane, a long chain alkane, is degraded by syntrophic bacteria to acetate and H₂ (Zengler *et al.*, 1999), hence, available for hydrogenotrophic methanogenesis in these layers. Enrichment cultures detected active *Methanomicrobiales* in the 80-100 cmbsf

section, and could account for the hydrogenotrophic methanogenesis measured at 88 cmbsf.

Below 100 cmbsf, acetoclastic methanogenesis was the dominant pathway for methane production, followed by methanol based methanogenesis. Hence, a shift from H₂/CO₂ methanogenesis to acetate methanogenesis occurs. Bicarbonate can also be converted to acetate by acetogens (Zepp Falz *et al.*, 1999). Acetogens were found to be important competitors of hydrogenotrophic methanogens in a low-sulfate hypersaline microbial mat collected from salterns in Baja (Kelley *et al.*, 2006). And, acetate concentrations increase below 100 cmbsf in the Napoli porewater sediments. Thus, the presence of acetogens below 100 cmbsf could explain the absence of hydrogenotrophic methanogenesis in these bicarbonate-depleted sediments.

Methanotrophic diversity.

In the presumed SMZT (20 to 40 cmbsf), methanol methanogenesis was measured, as well as the detection of ANME-1 members. The ANME-1 are known to mediate AOM, suggesting that AOM occurs in the proposed SMZT. In addition, cations concentrations in porewater indicated that carbonate precipitation, also mediated by AOM and high alkalinity, takes place in the presumed SMZT.

DGGE and *mcrA* clone library analysis showed that ANME-1 were present at all depth, except for the 80-100 cmbsf whereas the same analysis highlighted that ANME-2a were present from 40 to 120 cmbsf, with the same exception at 80-100 cmbsf. The ANME-2a and 2c subgroups are mostly recovered in environments dominated by low fluid fluxes (Mills *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2006; Niemann *et al.*, 2006) and high methane concentrations (Wegener *et al.*, 2008). Girguis *et al.* (2005) showed using flow rate experiments, that in higher flow regimes, ANME-1 could outgrow and outcompete ANME-2 for resources. Hence our results are consistent with this previous data. Presence of ANME-1 all along the sediment core could be explained by the high flow regime within the centre of the Napoli mud volcano. And, methane concentrations were found to increase below the supposed SMZT, i.e. below 40 cmbsf, where ANME-2 were first detected. Furthermore, the *mcrA* group a/b gene of the Napoli mud volcano form one distinct cluster within the phylogenetic tree. This cluster contains sequences closely affiliated with ANME-1 genes from hypersaline sediments of the Gulf of Mexico with 94 to 97 % of similarity. In their study, Lloyd *et al.* (2006) identified these ANME-1 as ANME-

1b subcluster, and proposed that these ANME-1b could be a high salt adapted subpopulation surviving in an environment where other ANME groups could not. Given the very high chloride concentrations measured in the Napoli sediment sections from which the clone libraries were constructed (i.e. 3000 mM at 40 cmbsf, and 4900 mM at 120 cmbsf) it is hence possible that the Napoli *mcrA a/b* sequences belong to the ANME-1 subcluster adapted to a high salinity habitats.

Methanococoides were found at the 40-60 cmbsf section, and the ANME-3 at the section 60-80 cmbsf just below. A similar distribution of *Methanococoides* and ANME-3 was previously reported by Goffredi *et al.* (2008) in sulfate-depleted methane-rich sediments of a whale-fall in the Monterey Canyon. The authors propose that depths distribution of these archaeal communities could show that ANME-3 are adapted to low available carbon sources, depleted by the upperlying *Methanococoides* methanogens. In Napoli center, ANME-3 sequences were closely related to an ANME-3 genes with high percentage of similarity (98%) recovered by Goffredi *et al.*

In their study of hypersaline sediments of a mud volcano in the Gulf of Mexico, Joye *et al.* (2009) did not find evidence of AOM, even though high methane fluxes were detected. Here we show indirect evidence of AOM occurring in hypersaline sediments, where methane is also present.

Influence of environmental factors on archaeal communities in the Napoli sediments.

The Napoli mud volcano represents a dynamic habitat where a hypersaline fluid regime impacted on the microbial abundance, activities and diversity including mainly methane producers. Two major factors are known to influence methanogenic pathways: temperature and availability of substrates (Zepp Falz *et al.*, 1999; Glissmann *et al.*, 2004). However hypersaline fluid flows might also regulate methanogenic process and diversity. Studies conducted on lake sediments show that a shift from 4 to 20°C induces a shift from acetate methanogenesis to H₂/CO₂ methanogenesis (Zepp Falz *et al.*, 1999; Glissmann *et al.*, 2004). Indeed Schulz *et al.* (1997) hypothesize that in lake sediments at low temperatures, hydrogenotrophic methanogens are limited by the lack of supply of H₂, which is linked with the idea that H₂-producing syntrophs are sensitive to low temperatures. In the Napoli sediments, the temperature at 70 cmbsf was around 14°C which could be one factor explaining

why overall hydrogenotrophic methanogenesis is higher than acetoclastic methanogenesis. And, traditionally high salinity favours hydrogenotrophic and methylotrophic methanogenesis, because acetoclastic methanogens cannot tolerate these conditions (>60‰) (Oren, 1999). However, we do observe acetate based methanogenesis in the Napoli sediments, at depths where chloride concentrations are higher than 4M (>140‰). A first example of acetoclastic methanogenesis at a salinity exceeding 60‰ has already been reported in brine sediments of a mud volcano in the Gulf of Mexico (Joye *et al.*, 2009), suggesting that some acetoclastic methanogens could have adapted to high salinity environments.

Uncultivated archaeal sequences affiliated with the MBG-D were detected in many saline and hypersaline environments (Benlloch *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008; Omoregie *et al.*, 2008). Jiang *et al.* (2008) propose that high salinity (12-13 psu) and alkalinity (pH≈9.3), among other unknown factors, could play an important role in controlling the distribution of marine benthic groups, such as the MBG-D. Hence the hypersaline regime in the Napoli center sediments could have influenced establishment of these MBG-D populations.

Thus, this brine affected mud volcano in the Mediterranean Sea represents a dynamic ecological niche for methanogens, that have to adapt to variations in fluid flow and composition, and high salinity. Detection of methanogenesis based on hexadecanes could imply that a deep oily reservoir underlies the Napoli mud volcano, and that there exists a deep origin of methanogens that could be transported by ascending fluids. Hence, active methanogens in surface sediments of the Napoli mud volcano might be directly connected and affected by the deep biosphere.

Acknowledgements.

We would like to thank Josée Sarrazin, the chief scientist of the MEDECO cruise, the ROV team, the officers and crew of the RV *Pourquoi Pas?* as well as the shipboard scientific community for their help at sea. This work was funded by the HERMES project Contract No: GOCE-CT-2005-511234-1, and by the ANR Deep Oasis.

REFERENCES

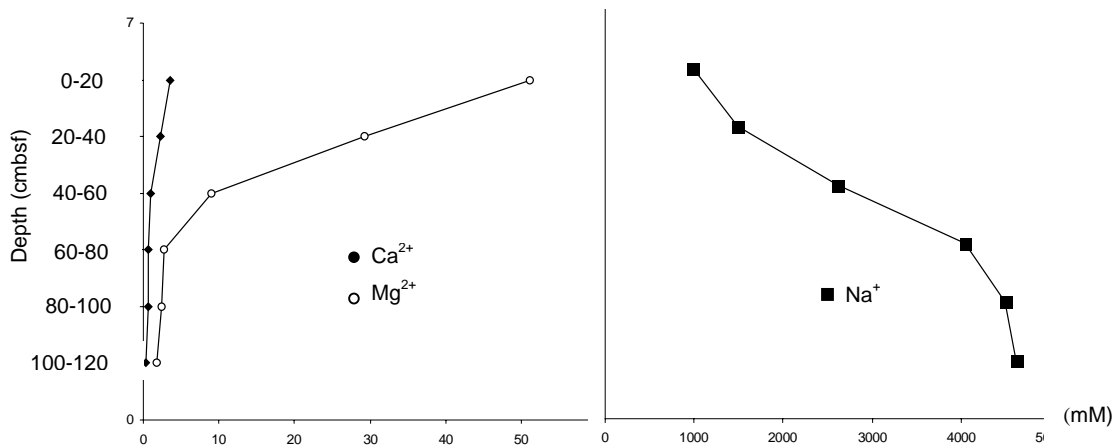
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW, & Lipman, DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Aloisi, G, Pierre, C, Rouchy, J-M, Foucher, J-P, & Woodside, J (2000). Methane-related authigenic carbonates of eastern Mediterranean Sea mud volcanoes and their possible relation to gas hydrate destabilisation. *Earth Planet Sci Lett* 184:321-338.
- Balch, WE, & Wolfe, RS (1976) New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl Environ Microbiol* 32: 781-791.
- Beal, EJ, House, CH, & Orphan, VJ (2009) Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. *Science* 325: 184-187.
- Benlloch, S, López-López, A, Casamayor, EO *et al.* (2002) Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ Microbiol* 4: 349-360.
- Boetius, A, Ravensschlag, K, Schubert, CJ, Rickert, D, Widdel, F, Gieske, A, *et al.* (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407: 623-626.
- Casamayor, EO, Schäfer, H, Baneras, L, Salio, CP, & Muyzer, G (2000) Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66: 499-508.
- Cetecioglu, Z, Ince, BK, Kolukirik, M, & Ince, O (2009) Biogeographical distribution and diversity of bacterial and archaeal communities within highly polluted anoxic marine sediments from the marmara sea. *Marine Pollution Bulletin* 58: 384–395.
- Charlou, JL, Donval, JP, Zitter, T, Roy, N, Jean-Baptiste, P, Foucher, JP, Woodside, J, & Party, MS (2003) Evidence of methane venting and geochemistry of brines on mud volcanoes of the eastern Mediterranean Sea. *Deep-sea research Part I* 50: 941-958.
- D'Hondt, S, Jørgensen, BB, Miller, DJ *et al.* (2004) Distributions of Microbial Activities in Deep Subseafloor Sediments. *Science* 306: 2216-2221.
- Daffonchio, D, Borin, S, Brusa, T *et al.* (2006) Stratified prokaryote network in the oxic–anoxic transition of a deep-sea halocline. *Nature* 440: 203-207.
- Dhillon, A, Lever, M, Llyod, KG, Albert, DB, Sogin, ML, & Teske, A (2005) Methanogen diversity evidenced by molecular characterization of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes in hydrothermal sediments of the Guyamas basin. *Appl Environ Microbiol* 71: 4592-4601.
- Dimitrov, LI (2003) Mud volcanoes-a significant source of atmospheric methane. *Geo-Marine Letters* 23: 155-161.
- Dolfing, J, Larter, SR, & Head, IM (2008) Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation. *ISME J* 2: 442–452.
- Fang, J, Shizuka, A, Kato, C, & Schouten, S (2006) Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene and lipid analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 429-441.
- Garcia, J-L, Patel, BKC, & Ollivier, B (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6: 205-226.
- Girguis, PR, E, CA, & DeLong, EF (2005) Growth and Population Dynamics of Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous-Flow Bioreactor. *Appl Environ Microbiol* 71: 3725-3733.
- Glissmann, K, Chin, K-J, Casper, P, & Conrad, R (2004) Methanogenic Pathway and Archaeal Community Structure in the Sediment of Eutrophic Lake Dagow: Effect of Temperature. *Microb Ecol* 48: 389-399.
- Goffredi, SK, Wilpiseski, R, Lee, R, & Orphan, VJ (2008) Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California. *ISME J* 2: 204-220.
- Haese, RR, Hensen, C, & de Lange, GJ (2006) Pore water geochemistry of eastern Mediterranean mud volcanoes: Implications for fluid transport and fluid origin. *Mar Geol* 225: 191- 208.
- Hales, BA, C, E, Titchie, DA, Hall, G, W, PR, & R, SJ (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 62.
- Hall, TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.
- Hallam, SJ, Girguis, PR, Preston, CM, Richardson, PM, & DeLong, EF (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Appl Environ Microbiol* 69: 5483-5491.

- Hallam, SJ, Putnam, N, Preston, CM, Detter, JC, Rokhsar, D, Richardson, PM, & DeLong, EF (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* 305: 1457-1462.
- Heijs, SK, Laverman, AM, Forney, LJ, Hardoim, PR, & Dirk van Elsland, J (2008) Comparison of deep-sea sediment microbial communities in the Eastern Mediterranean. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 362-377.
- Holmer, M, & Kristensen, E (1994) Coexistence of sulfate reduction and methane production in an organic-rich sediment. *Mar Ecol Prog Ser* 107: 177-184.
- Inagaki, F, Tsunogai, U, Suzuki, M, Kosaka, A, Machiyama, H, Takai, K, Nunoura, T, *et al.* (2004) Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxrA*, *mcrA*, and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 70: 7445-7455.
- Janse, I, Bok, J, & Zwart, G (2004) A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 57: 279–281.
- Jiang, H, Dong, H, Yu, B, Ye, Q, Shen, J, Rowe, H, & Zhang, C (2008) Dominance of putative marine benthic Archaea in Qinghai Lake, north-western China. *Environ Microbiol* 10: 2355–2367.
- Joye, SB, Connell, TL, Miller, LG, Oremland, RS, & Jellison, RS (1999) Oxidation of ammonia and methane in an alkaline, saline lake. *Limnol Oceanogr* 44: 178-188.
- Joye, SB, Samarkin, VA, Orcutt, BN *et al.* (2009) Metabolic variability in seafloor brines revealed by carbon and sulphur dynamics. *Nature Geoscience* 2: 349-354.
- Kelley, CA, Prufert-Bebout, LE, & Bebout, BM (2006) Changes in carbon cycling ascertained by stable isotopic analyses in a hypersaline microbial mat. *Journal of geophysical research* 111: doi:10.1029/2006JG000212.
- Kendall, MM, & Boone, DR (2006) Cultivation of methanogens from shallow marine sediments at Hydrate ridge, Oregon. *Archaea* 2: 1-8.
- Kendall, MM, Wardlaw, GD, Tang, CF, Bonin, AS, Liu, Y, & Valentine, DL (2007) Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 73: 407-414.
- Knittel, K, & Boetius, A (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annu Rev Microbiol* 63: 311–334.
- Knittel, K, Lösekann, T, Boetius, A, Kort, R, & Amann, R (2005) Diversity and distribution of methanotrophic Archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* 71: 467-479.
- Krüger, M, Meyerdierks, A, Glöckner, FO *et al.* (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* 426: 878-881.
- Kvenvolden, KA (1988) Methane hydrates-A major reservoir of carbon in the shallow geosphere ? *Chem Geol* 71: 41-51.
- Larkin, MA, Blackshields, G, Brown, NP *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lloyd, KG, Lapham, L, & Teske, A (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b Archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl Environ Microbiol* 72: 7218-7230.
- Lösekann, T, Knittel, K, Nadalig, T, Fuchs, B, Niemann, H, Boetius, A, & Amann, R (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol* 73: 3348-3362.
- Luton, PE, Wayne, JM, Sharp, RJ, & Riley, PW (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148: 3521-3530.
- Lyimo, TJ, Pol, A, Op den Camp, HJM, Harhangi, HR, & Vogels, GD (2000) *Methanosarcina semesiae* sp. nov., a dimethylsulfide-utilizing methanogen from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 171–178.
- Lyimo, TJ, Pol, A, Jetten, MSM, & Op den Camp, HJM (2009) Diversity of methanogenic archaea in a mangrove sediment and isolation of a new *Methanococcoides* strain. *FEMS Microbiol Ecol* 291: 247–253.
- Milkov, A (2000) Worldwide distribution of submarine mud volcanoes and associated gas hydrates. *Mar Geol* 167: 29-42.
- Mills, HJ, Martinez, RJ, Story, S, & Sobocky, PA (2004) Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with *Beggiatoa* species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Appl Environ Microbiol* 70: 5447-5458.
- Mills, HJ, Hodges, C, Wilson, K, MacDonald, IR, & Sobocky, PA (2003) Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiol Ecol* 46: 39-52.

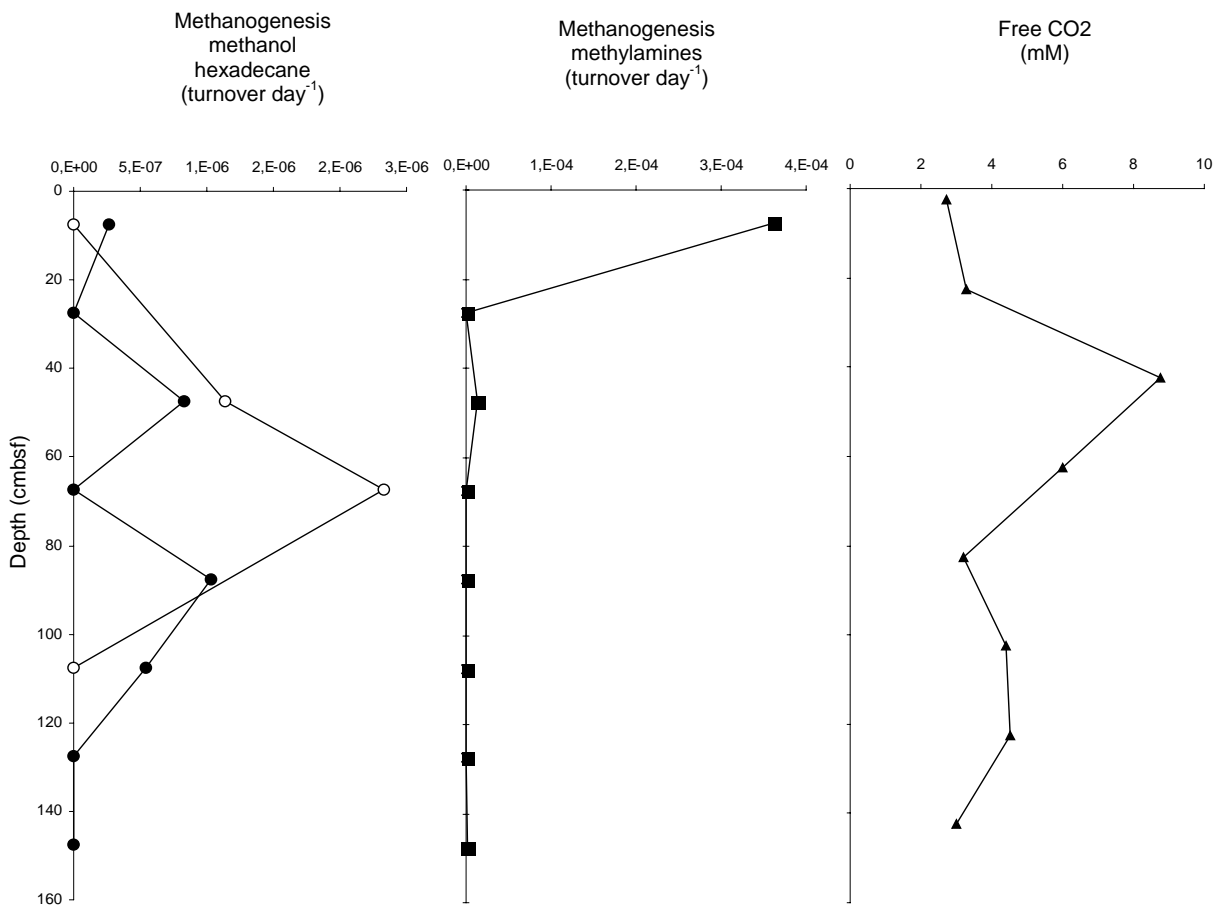
- Newberry, CJ, Webster, G, Cragg, BA, Parkes, RJ, Weightman, AJ, & Fry, JC (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environ Microbiol* 6: 274-287.
- Niemann, H, Duarte, J, Hensen, C, Omoregie, E, Magalhaes, VH, Elvert, M, Pinheiro, LM, Kopf, A, & Boetius, A (2006) Microbial methane turnover at mud volcanoes of the Gulf of Cadiz. *Geochim Cosmochim Acta* 70: 5336-5355.
- Olu-Le Roy, K, Sibuet, M, Fiala-Médioni, A, Gofas, S, Salas, C, Mariotti, A, Foucher, J-P, & Woodside, J (2004) Cold seep communities in the deep eastern Mediterranean Sea: composition, symbiosis and spatial distribution on mud volcanoes. *Deep-sea research Part I* 51: 1915-1936.
- Omoregie, EO, Mastalerz, V, de Lange, G, Straub, KL, Kappler, A, Røy, H, Stadnitskaia, A, Foucher, J-P, & Boetius, A (2008) Biogeochemistry and Community Composition of Iron- and Sulfur-Precipitating Microbial Mats at the Chefred Mud Volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl Environ Microbiol* 74: 3198-3215.
- Oren, A (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 334-348.
- Ovreas, L, Forney, L, Daae, FL, & Torsvik, V (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63: 3367-3373.
- Parkes, RJ, Cragg, BA, & Wellsbury, P (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeology journal* 8: 11-28.
- Parkes, RJ, Webster, G, Cragg, BA, Weightman, AJ, Newberry, CJ, Ferdelman, TG, Kallmeyer, J, Jorgensen, BB, Aiello, IW, & Fry, JC (2005) Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological times. *Nature* 436: 390-394.
- Parkes, RJ, Cragg, BA, Banning, N, Brock, F, Webster, G, Fry, JC, Hornibrook, E, *et al.* (2007) Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ Microbiol* 9: 1146-1161.
- Perreault, NN, Andersen, DT, Pollard, WH, Greer, CW, & Whyte, LG (2007) Characterization of the Prokaryotic Diversity in Cold Saline Perennial Springs of the Canadian High Arctic. *Appl Environ Microbiol* 73: 1532-1543.
- Purdy, KJ, Munson, MA, Cresswell-Maynard, T, Nedwell, DB, & Embley, TM (2003) Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate function and phylogeny of sulphate-reducing bacteria and methanogenic archaea in a UK estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 361-371.
- Raghoebarsing, AA, Pol, A, van de Pas-Schoonen, KT *et al.* (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440: 918-921.
- Roussel, EG, Sauvadet, A-L, Allard, J, Chaduteau, C, Richard, P, Cambon Bonavita, M-A, & Chaumillon, E (2009) Archaeal Methane Cycling Communities Associated with Gassy Subsurface Sediments of Marennes-Oléron Bay (France). *Geomicrobiol J* 26: 31-43.
- Sarradin, P-M, & Caprais, JC (1996) Analysis of dissolved gases by headspace sampling, gas chromatography with columns and detectors commutation. Preliminary results. *Analytical Communications* 33: 371-373.
- Schulz, S, Matsuyama, H, & Conrad, R (1997) Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol Ecol* 22: 207-213.
- Singh, N, Kendall, MM, Liu, Y, & Boone, DR (2005) Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococcoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosacina baltica*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2531-2538.
- Singleton, DR, Furlong, MA, Rathbun, SL, & Whitman, WB (2001) Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* 67: 4374-4376.
- Sørensen, KB, Canfield, DE, Teske, AP, & Oren, A (2005) Community Composition of a Hypersaline Endoevaporitic Microbial Mat. *Appl Environ Microbiol* 70: 7352-7365.
- Tamura, K, Dudley, J, Nei, M, & Kumar, S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Thauer, RK (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144: 2377-2406.
- van der Wielen, PWJJ, Bolhuis, H, Borin, S *et al.* (2005) The Enigma of Prokaryotic Life in Deep Hypersaline Anoxic Basins. *Science* 307: 121-123.
- Vetriani, C, Jannasch, HW, J, MB, Stahl, DA, & Reysenbach, A-L (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microbiol* 65: 4375-4384.

- 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. *Journal of microbiological methods* 55: 155-164.
- Webster, G, Blazejak, A, Cragg, BA *et al.* (2008) Subsurface microbiology and biogeochemistry of a deep, cold-water carbonate mound from the Porcupine Seabight (IODP Expedition 307). *Environ Microbiol.*
- Wegener, G, Niemann, H, Elvert, M, Hinrichs, K-U, & Boetius, A (2008) Assimilation of methane and inorganic carbon by microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane. *Environ Microbiol.*
- Zengler, K, Richnow, HH, Rossello-Mora, R, Michaelis, W, & Widdel, F (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401: 266-269.
- Zepp Falz, K, Holliger, C, Grosskopf, R, Liesack, W, Nozhevnikova, AN, Müller, B, Wehrli, B, & Hahn, D (1999) Vertical Distribution of Methanogens in the Anoxic Sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl Environ Microbiol* 65: 2402–2408.
- Zhou, J, Bruns, MA, & Tiedje, JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316-322.

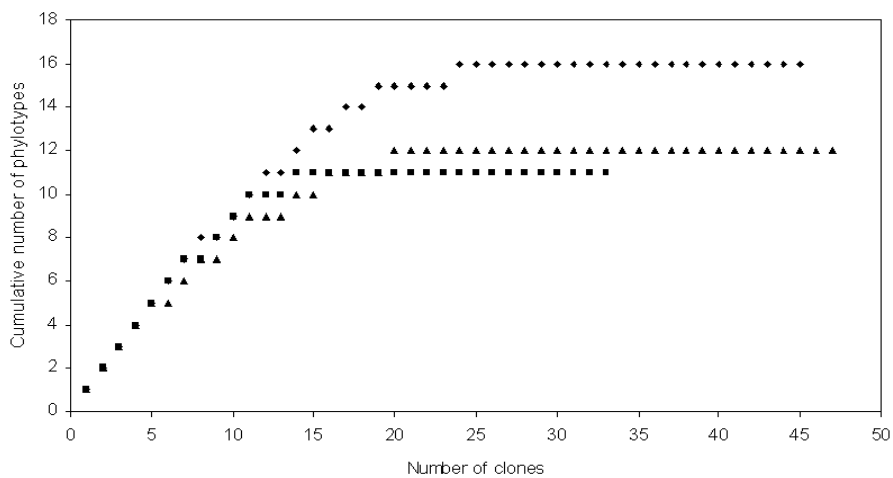
SUPPLEMENTARY MATERIAL



SM1. Depth profiles of the porewater concentrations of Mg^{2+} , Na^{+} , and Ca^{2+} in the Napoli mud volcano centre sediments.



SM2. Depth profiles of methanogenic activities from methylamines, methanol and hexadecane, and free CO_2 in the Napoli mud volcano center sediments. Methanogenic rates are expressed in turnover/day.



SM3: Rarefaction analysis of the *mcrA* gene libraries, done using the RarFac program. Dots represent the 100-120 cbsf gene library, squares the 60-80 cbsf, and triangles the 40-60 cbsf.

Phylogenetic affiliation	Clone	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)
<i>Methanococcoides</i>	NapK-40_60-mcrA02	strain DSM 17273 (AB353221) <i>Methanococcoides alaskense</i>	99
	NapK-40_60-mcrA12	strain DSM 17273 (AB353221) <i>Methanococcoides alaskense</i>	99
	NapK-100_120-mcrA10	MOBOcr43040 (AM942090) Gassy Subsurface Sediments of Marennes-Oleron Bay	86
<i>mcrA</i> group e	NapK-40_60-mcrC06	SMI1-GC205-mcr67 (DQ521857) Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico	94
	NapK-100_120-mcrH06	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97
<i>mcrA</i> group a/b	NapK-40_60-mcrA04	SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864) Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico	97
	NapK-40_60-mcrA10	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrB02	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrB06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrB08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrB10	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrC08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrC10	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrD02	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrD04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrD06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrD08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrD10	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrD12	SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864) Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico	96
	NapK-40_60-mcrE08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrE10	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95
	NapK-40_60-mcrF02	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrF04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrF06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrF08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrF10	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95
	NapK-40_60-mcrG06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	87
	NapK-40_60-mcrG08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrG12	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92
	NapK-40_60-mcrH02	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-40_60-mcrH05	SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864) Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico	96
	NapK-40_60-mcrH08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95
	NapK-40_60-mcrH12	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
	NapK-60_80-mcrA06	GZfos_9_28.6 (AY324372) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	98
	NapK-60_80-mcrA08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	87
	NapK-60_80-mcrA09	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	91
	NapK-60_80-mcrA12	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
NapK-60_80-mcrB08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92	
NapK-60_80-mcrC04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92	
NapK-60_80-mcrC08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95	

NapK-60_80-mcrD07	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-60_80-mcrE04	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-60_80-mcrE12	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-60_80-mcrF02	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	96
NapK-60_80-mcrF04	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	93
NapK-60_80-mcrF12	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	93
NapK-60_80-mcrH04	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	93
NapK-60_80-mcrH06	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-60_80-mcrH08	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-60_80-mcrH10	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	93
NapK-60_80-mcrH12	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrA02	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrA06	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864)	95
NapK-100_120-mcrA08	Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico GZfos_9_28.6 (AY324372)	97
NapK-100_120-mcrB02	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon GZfos_9_28.6 (AY324372)	97
NapK-100_120-mcrB04	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrC02	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrC06	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	93
NapK-100_120-mcrD08	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	93
NapK-100_120-mcrD12	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864)	96
NapK-100_120-mcrE04	Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrE06	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrE08	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	95
NapK-100_120-mcrE12	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864)	94
NapK-100_120-mcrF02	Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrF04	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrF06	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	93
NapK-100_120-mcrF08	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	96
NapK-100_120-mcrF10	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrG02	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	96
NapK-100_120-mcrG06	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrG08	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon GZfos_9_28.6 (AY324372)	98
NapK-100_120-mcrG10	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon GZfos_9_28.6 (AY324372)	97
NapK-100_120-mcrH02	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	93
NapK-100_120-mcrH10	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	92
NapK-100_120-mcrH12	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon F17.1_30A02 (AY324363)	94
	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	

SM4: Closest relatives of representative clones from *mcrA* gene libraries from depths 40 to 60 cmbsf (NapK-40_60), 60 to 80 cmbsf (NapK-60_80), 100 to 120 cmbsf (NapK-100_120) for the Napoli mud volcano.

CHAPITRE 2

Etude de la diversité des populations *Archaea* dans des sédiments hypersalés associés avec un tapis microbien orange du volcan de boue Napoli

Préambule

Dans les sédiments marins associés à la migration de fluides froids, des bactéries filamenteuses (appartenant généralement aux genres communs *Thioploca* et *Beggiatoa*) se développent dans des zones de transition oxiqve/anoxiqve. Au niveau de ces interfaces, les sulfures d'origine biogénique ou thermogénique, viennent en contact avec l'oxygène ou le nitrate provenant de la colonne d'eau. Les bactéries filamenteuses sont donc adaptées à la présence simultanée de gradients intenses et opposés de sulfure et d'oxygène. Ainsi, les habitats sédimentaires colonisés par des tapis microbiens sont certainement des niches privilégiées pour le développement de communautés microbiennes singulières.

Nous avons par conséquent étudié la diversité des communautés *Archaea* dans des sédiments hypersalés recouverts de tapis microbiens de couleur orange du volcan de boue Napoli, et à proximité de lacs de saumures. La présence des tapis microbiens de couleur orange en surface des sédiments peut refléter l'existence de flux de fluides comparables à ceux rencontrés dans le même type d'habitat (HMMV), où les débits de fluides estimés sont modérés et dix fois moins importants que dans le centre dit actif du volcan de boue.

Pour étudier la diversité microbienne dans ces sédiments recouverts de tapis microbiens de couleur orange du volcan de boue Napoli, nous avons analysé la distribution des communautés *Archaea* en fonction de la profondeur de sédiment par la méthode de PCR-DGGE. La fraction de la communauté *Archaea* métaboliquement active a été étudiée par la construction d'une banque de clones basée sur les gènes codant l'ARNr 16S dérivés d'extraits d'ARN. Les communautés méthanotrophes ont été examinées en fonction de la profondeur par un inventaire des gènes *mcrA*, et la fraction cultivable a été recherchée à l'aide de milieux de culture spécifiques.

Metabolically active archaeal populations in hypersaline sediments associated with an orange microbial mat from the Napoli Mud Volcano

(in preparation)

Cassandra Sara Lazar, Stéphane L'Haridon, Patricia Pignet, Daniel Prieur, and Laurent Toffin

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, Ifremer Centre de Brest, Département Etudes des Environnements Profonds, Université de Bretagne Occidentale, BP70, 29280 Plouzané, France.

Correspondance : Laurent Toffin, Tel. : +33(0)2 98 22 43 96, Fax. +33(0) 98 22 47 57, e-mail: Laurent.toffin@ifremer.fr.

ABSTRACT

Microbial mats in marine cold seeps are known to be associated with ascending sulfide- and methane-rich fluids. Hence they could be visible indicators of AOM and methane cycling processes in underlying sediments. The Napoli mud volcano is situated in the Olimpi Area that lies on top of saline deposits that upflow from deep hot sources as brine fluids to the seafloor. Sediments associated with a brine pool and microbial orange mats of the Napoli mud volcano were recovered during the Medeco cruise. The metabolically active fraction of the archaeal community was composed of many uncultured lineages, such as RC-V, MBG-D, SM1, and DHVE4. *mcrA* gene libraries were constructed with sediment depth, and *mcrA* genes were affiliated with the ANME-1, ANME-2a and ANME-2c groups, suggesting that AOM occurred in these sediment layers. Enrichment cultures showed presence of the methylotrophic *Methanococcoides* in the 0 to 4 cmbsf sediment layers. Surprisingly, no known halophilic or halotolerant *Archaea* were highlighted in these hypersaline sediments. Thus, the archaeal community diversity seems to show that active methane cycling take place in the hypersaline microbial mat-associated sediments of the Napoli mud volcano.

INTRODUCTION

Over 200 mud volcanoes have been found along the northern flank of the Mediterranean Ridge in the eastern Mediterranean Sea (Charlou *et al.*, 2003). The formation of the Mediterranean Ridge is linked to the collisional tectonics between the African and Eurasian plates, resulting in intensive faulting (Haese *et al.*, 2006). Within the Mediterranean Ridge, the Olimpi area situated south of Crete is a dynamic environment containing active seepage of mud, fluid and brines. During the Messinian salinity crisis, evaporites were deposited in the Mediterranean Basins (Zitter *et al.*, 2005). Hence, continuous dissolution of the evaporitic layer and upward diffusion of deep brines are occurring in the Olimpi area (Dählmann and de Lange, 2003). Thus, mud volcanism is often associated with brine seeps in this area (Zitter *et al.*, 2005). The Napoli mud volcano is a submarine circular dome belonging to the Olimpi area (Fig. 1). Subsurface brines intrude into the seafloor of the mud volcano creating brine pools and lakes with diameters ranging from centimeters to meters (Charlou *et al.*, 2003). The highest fluid flows are generally located near the center of the mud volcano where carbonates are often formed in the Mediterranean Ridge.

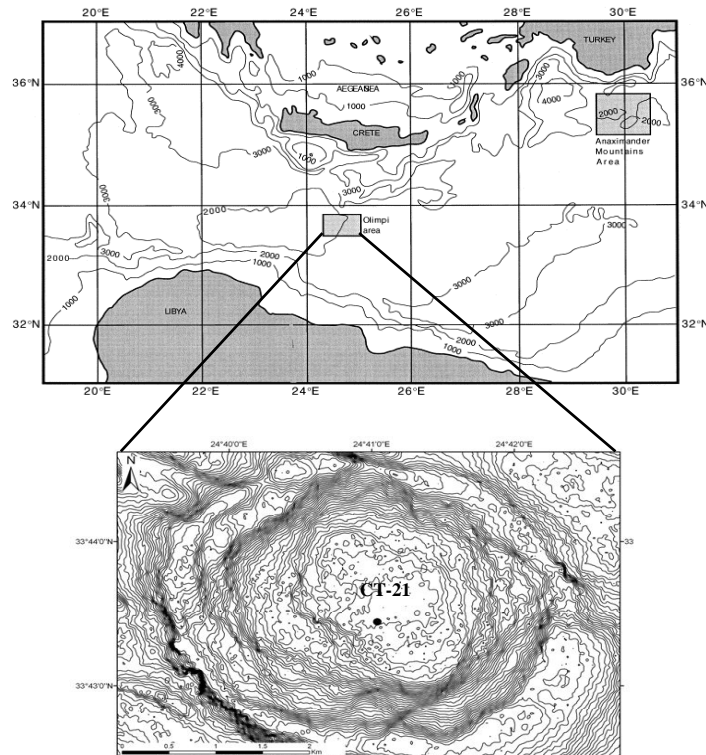


Figure 1: A) Location map showing the Olimpi area in the Eastern Mediterranean Sea. From Aloisi *et al.* (2000). B) Closer view on the Napoli mud volcano and the position of the sampled push core (Bénédicte Ritt, pers. comm.).

Most of the methane rising up does not reach the seafloor because it is consumed by a microbially mediated process known as anaerobic oxidation of methane (AOM) (Lösekan *et al.*, 2007). AOM is driven by methanotrophic Archaea (ANME), and is mainly coupled to sulfate reduction (SR) driven by sulfate reducing bacteria (SRB). ANME are divided into three groups, ANME-1, ANME-2 and ANME-3. The ANME-1 are distantly affiliated with methanogenic clusters of the *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales*, the ANME-2 with the methanogenic order of the *Methanosarcinales*, and the ANME-3 with the methanogenic genus *Methanococoides/Methanlobus*. The ANME have not yet been obtained in pure culture, and the biochemical pathways of AOM remain unknown. However, ANME could reverse methanogenesis using a modified methyl coenzyme M reductase (MCR) enzyme (Hallam *et al.*, 2003; Krüger *et al.*, 2003; Hallam *et al.*, 2004), which catalyzes the final step of methanogenesis (Thauer, 1998). The *mcrA* gene, encoding the MCR, is unique and found in all methanogens and thus methanotrophs (Thauer, 1998). Phylogenetic *mcrA* based trees mirror the phylogeny of the 16S rRNA genes for all known methanogens (Hales *et al.*, 1996; Luton *et al.*, 2002). And, the *mcrA* genes are conserved genes making them specific and useful functional gene markers, targeting methanogens and methanotrophs in the environment.

Dense filamentous microbial mats on the seafloor of cold seep sediments are visible to the naked eye. These mats are mainly composed of large cells (diameter of 12 to 160 μm (McHatton *et al.*, 1996)), pigmented (orange and white) and unpigmented. Such mat- and sediment-associated microbial communities have been shown to support high rates of sulfate-reduction (Boetius *et al.*, 2000; Joye *et al.*, 2004), sulfur-oxidation (Otte *et al.*, 1996), nitrate reduction (Boetius *et al.*, 2000; Joye *et al.*, 2004) and anaerobic methane oxidation (Boetius *et al.*, 2000; Joye *et al.*, 2004). Members of these communities have been previously identified as filamentous sulfur-oxidizing bacteria of the *Beggiatoa* sp., *Thioplaca* sp., *Leucothrix*, *Thirotrix* and *Desmanthos* (Heijs *et al.*, 2005), but also diverse *Proteobacteria* (Mills *et al.*, 2004; Heijs *et al.*, 2005) and *Archaea* (Michaelis *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2004). Thus underlying mat sediments provide alternative niches for diverse active archaeal communities adapted to dynamic changes of fluid flow regimes.

In the present study archaeal community structure and diversity with depth in hypersaline sediments associated with orange-pigmented mats of the Napoli mud volcano were analyzed. The main objectives in this study were to characterize the

metabolically active fraction of the archaeal communities in sediments associated with the microbial mat. Vertical distribution pattern of Archaeal communities with depth was assessed using PCR-DGGE. And total RNA was extracted from sediment depths 0 to 4 cmbsf and subjected to reverse-transcription PCR with primers specific of the archaeal 16S rRNA genes. Then, methanotrophic diversity based on *mcrA* genes from two different sediment depths (2 to 4 and 8 to 10 cmbsf) was determined.

MATERIALS AND METHODS

Sediment sampling and porewater analysis.

Sediment samples were collected in the Napoli Mud Volcano, in the Eastern Mediterranean Sea during the Ifremer Medeco cruise with the research vessel *Pourquoi Pas?* in October/November 2007. Sediment sample CT-21 was recovered during dive PL 331-10 by the remotely operated vehicle (ROV) VICTOR 6000 (Ifremer)-operated push core from 1938 metres of water depth (N 33°43.4397, E 24°41.0385). In the sampled area, sediments were recovered with dense orange microbial mats. Brine pools and rivers were observed in close proximity to the microbial orange mats. The sediment push-core sample contained bacterial orange filaments that penetrated the first 3 cm layers. Immediately after retrieval, the sediment core was sectioned aseptically in 2-cm-thick layers in the cooling room (4°C), and frozen at -80°C for nucleic acid extractions until analyzed.

Depth distribution of dissolved sulfate and chloride were quantified from diluted pore waters. Porewater was obtained by centrifuging approximately 10 g of crude sediment, 15 minutes, 3000 x g at 4°C. The porewater was then stored at -20°. Sulfate and chloride were analyzed using standard ion chromatographic techniques. Sulfate and chloride concentrations were measured using ion exchange chromatography, with a isocratic DX120 ion chromatography system (DIONEX Corporation, Sunnyvale, CA) fitted with Ionpac AS9-SC columns and a suppressor (ASRS-ultra II) unit in combination with a DS4-1 heated conductivity cell. Components were separated using a sodium carbonate gradient, with a flow of 1.5 mL.min⁻¹.

Culture media for enrichment of methanogens.

Enrichment were performed anaerobically in 50 mL vials according to Balch and Wolfe (1976). Medium 141 from the DSMZ were used with slight modifications : organic substrates were omitted except yeast extract with a concentration adjusted to 0.2 g L^{-1} . The medium was prepared and sterilized under 80 % N_2 and 20 % CO_2 gas atmosphere. In order to enrich CO_2 -reducing, acetoclastic and methylotrophic methanogens, three enrichment media supplemented with H_2 (200 kPa), acetate (10 mM), trimethylamine (TMA, 20 mM) were used. 1 g of sediment from the different sections of CT21 was inoculated into 9 mL of medium (pH 7), the suspension was mixed and serially diluted until 10^{-3} . The cultures were incubated at 15°C to mimic *in situ* conditions. Cultures were periodically checked for methane production for one year. The methane detection was performed directly in the headspace of vial cultures by a micro MTI M200 Gas Chromatograph equipped with MS-5A capillary column and Poraplot U capillary column. Positive enrichment dilutions of methanogens were monitored by PCR-DGGE. For dilutions showing one DGGE band on the fingerprint, 16S rRNA genes were amplified using the A8F and A1492R primers, cloned and sequenced as mentioned hereafter.

Nucleic acids extraction and purification.

Total genomic DNA was directly extracted and purified from 5 g of wet sediment for all sections in duplicates, by using the Zhou *et al.* (1996) method with modifications. Sediment samples were mixed with DNA extraction buffer as described by Zhou *et al.*, and then frozen in liquid N_2 then thawed at a 65°C , 3 times. The pellet of crude nucleic acids obtained after centrifugation, was washed with cold 80% ethanol, and resuspended in sterile deionized water, to give a final volume of 100 μL . Crude DNA extracts were then purified using the Wizard DNA clean-up kit (Promega, Madison, WI). DNA extracts were aliquoted and stored at -20°C until required for PCR amplification. Total RNA was directly extracted and purified from 2g of wet sediment from pooled sediment sections 0 to 6 cmbsf, using the RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MO BIO Labs. Inc., Carlsbad, CA) according to manufacturer recommendations. Aliquots of RNA extracts were treated by Turbo DNase (Applied Biosystems, Foster City, CA) and purified using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The quality of RNA samples was examined by agarose-gel electrophoresis and concentrations were

determined using spectrophotometry (Nanodrop ND-100, NanoDrop Technologies Wilmington, DE, USA).

Archaeal 16S rRNA PCR-DGGE amplification.

Archaeal 16S rRNA genes were amplified by PCR from purified DNA extracts using the Archaeal targeted primers pair 8F (5'-CGGTTGATCCTGCCGGA-3') and 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Casamayor *et al.*, 2000). All PCR reactions (total volume reaction 25 μ L) contained 1 μ L purified DNA template (1/25 dilution), 1 X PCR buffer (Promega, Madison, WI), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer (Eurogentec) and 0.6 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI). Amplification was carried out using the GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 49°C for 1 min 30 s, and extension at 72°C for 2 min for 30 cycles. All the archaeal 16S rRNA gene PCR products were then re-amplified in a nested PCR with primers 340F (5'-CCCTACGGGGYGCASCAG-3') (Vetriani *et al.*, 1999) containing a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3') at the 5' end and 519R (5'-TTACCGCGGCKGCTG-3') (Ovreas *et al.*, 1997). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 72°C to 62°C (touchdown -0,5°C.cycle⁻¹) for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 20 cycles, then denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 10 cycles.

To restrict contamination to a minimum, PCR experiments was carried out under aseptic conditions (Captair® bio, Erlab, Fisher Bioblock Scientific) using autoclaved and UV-treated plasticware and pipettes, and only sterile nuclease-free molecular grade water (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Positive (DNA extracted from pure cultures) and negative (molecular grade water) controls were used in all PCR amplifications.

DGGE fingerprinting analysis.

DGGE was carried out as described by Toffin *et al.* (2004) with some modifications. PCR products were separated by DGGE using the D-Gene™ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) on 8% (w/v) polyacrylamide gels (40% acrylamide/bis solution 37.5:1 Bio-Rad) with a gradient of denaturant between 20% and 60%. A

denaturing gradient gel consists of [100% denaturant equals 7M urea and 40% (v/v) formamide]. Gels were poured with the aid of a 30 mL volume Gradient Mixer (Hoefer SG30, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and prepared with 1 X TAE buffer (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Electrophoresis was carried out at 60°C, 200 V for 5 hours (with an initial electrophoresis for 10 min at 80 V) in 1 X TAE buffer. Polyacrylamid gels were stained with SYBRGold nucleic acid gel stain (Invitrogen, San Diego, CA) for 30 min, and viewed using the Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Synthesis of cDNA by reverse transcription, PCR amplification, construction and analysis of 16S cRNA gene libraries.

Aliquots of purified RNA were initially denatured by incubating at 65°C for 10 min, and 7.7 µM of 16S reverse primer 915R was added to the denatured RNA. The reaction mixture was then incubated at 70°C for 10 min. The rRNA-cDNA heteroduplexe was synthesised by two steps reverse transcription using the 16S rRNA archaeal targeted reverse primer 915R (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') (Casamayor *et al.*, 2002) and the Moloney Murine Leukaemia Virus reverse transcriptase (M-MuLV, MP Biomedicals, Irvine, CA) according to the manufacturer's protocol. The reverse transcription reaction mixture consisted of 100 to 200 ng of denatured RNA and 16S rRNA reverse primer 915R, 1 X M-MuLV buffer, 200 µM of deoxynucleoside triphosphate mix, and 10 mM DTT (dithiothreitol). The reverse transcription reaction mix was incubated at 42°C for 2 min. A 200-unit aliquot of M-MuLV Reverse Transcriptase was added prior to a 80 min incubation at 42°C that resulted in the transcription of the RNA into complementary 16S ribosomal DNA (cDNA). The reverse transcriptase reaction was then stopped by heating the solution at 70°C during 15 minutes. The cDNA end product was used as a template for archaeal 16S based PCR using the following primers: 340F and 915R.

The PCR amplification involved 20 cycles each consisting of 94°C for 1 min, 71°C to 61°C (touchdown -1°C.cycle⁻¹) for 1 min, and 72°C for 2 min. The purified RNA extracts that were not reverse transcribed were also amplified by PCR using the same primers, in order to monitor possible DNA contaminations of RNA templates. No contaminating DNA was detected in any of these reactions.

PCR products were purified with the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and analyzed on 1% (w/v) agarose gels run in 1 X TAE buffer stained with

ethidium bromide and then UV-illuminated. Purified PCR products were cloned into TOPO XL PCR Cloning Kit, and transformed into *Escherichia coli* TOP10 cells (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations.

Construction of *mcrA* environmental gene libraries.

The *mcrA* genes were amplified using the ME1 (5'-GCMATGCARATHGGWATGTC-3') and ME2 (5'-TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT-3') primers (Hales *et al.*, 1996). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 50°C for 1'30 min, and extension at 72°C for 3 min, for 30 cycles. PCR products were purified on a 1% agarose gel using the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and cloned using the TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocols. The *mcrA* gene sequences were determined on a ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') universal primer.

Phylogenetic analysis of DNA.

The gene sequencing was performed by *Taq* cycle sequencing and determined on a ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') universal primer. RNA-derived cDNA, DNA-derived *mcrA* and enrichment culture-derived 16S rRNA gene sequences were analyzed using the NCBI BLAST search program within GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul *et al.*, 1990). The presence of chimeric sequences in the clone libraries was determined with the CHIMERA CHECK program of the Ribosomal Database Project II (Center for Microbial Ecology, Michigan State University, <http://wdcm.nig.ac.jp/RDP/html/analyses.html>). Potential chimeras were eliminated before phylogenetic trees were constructed. The RNA-derived 16S rRNA sequences were then edited in the BioEdit v7.0.5 program (Hall, 1999) and aligned using the SINA webaligner (<http://www.arb-silva.de/>). The *mcrA* sequences were translated into amino acid sequences using BioEdit and aligned using ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). Sequence data were analysed with the MEGA4.0.2 program (Tamura *et al.*, 2007). The phylogenetic trees were calculated by the neighbour-joining analysis. The robustness of inferred topology was tested by bootstrap resampling (1000). Rarefaction curves were calculated for each gene library using the RarFac program (<http://www.icbm.de/pmbio/>), and we used 85% and 95%

similarity levels to define the groups of sequences. We used 85% because of the low rDNA similarity intralineaage levels of the uncultured groups to which are affiliated the clones of the RNA-derived 16S cDNA library, and 95% for the *mcrA* gene libraries. Libraries' coverage was calculated using the following formula: $C=[1-(n_1/N)]*100$, where n_1 is the number of unique OTUs, and N is number of clones in the library (Singleton *et al.*, 2001).

Statistical analyses of DGGE banding patterns.

The DGGE profile was analyzed as described by Fry *et al.* (2006), using a presence/absence scoring of the DGGE bands. After making a grid to determine whether bands were present (score=1) or absent (score=0) for each lane on a same line of the DGGE profile, a presence/absence matrix was obtained. This matrix was then used to build a similarity matrix based on the Jaccard coefficient, using the vegan package within the R software (R Development Core, 2008). Finally, a dendrogram was obtained using the ward agglomeration method within the hierarchical clustering package of the R software.

Nucleotide sequence accession numbers.

The sequence data reported here will appear in GenBank nucleotide sequence databases under the accession no. XXX to XXX for RNA-derived 16S rRNA genes, and XXX to XXX for *mcrA* genes.

RESULTS and DISCUSSION

Geochemical and biological characteristics.

Observation of large orange-pigmented mats on the surface of the sampled sediment core and direct microscopic examination of filamentous morphology suggests that the *bacteria* probably belong to the *Beggiatoa* genus (data not shown), as reported elsewhere (Nikolaus *et al.*, 2003). However, other microorganisms without clear identification were also present.

Sulfate and chloride concentrations in porewater sediments underlying the orange microbial mats were determined. The chloride porewater profile showed an increase in concentration with depth (Fig. 2), reaching 1200 mM at 10 cmbsf, which is more than 2 times higher than seawater concentrations. This is clearly linked with the upflowing brines from deep sources. The surface sediment layers colonized by the

orange-pigmented mat *bacteria* highlighted chloride concentrations of 700 mM, and could be influenced by the brine pools contiguous to the filamentous *bacteria* on the seafloor. Moreover *Beggiatoa* mats are a common feature found in habitats influenced by hypersaline brine fluid intrusions (Mills *et al.*, 2004; Omoregie *et al.*, 2008).

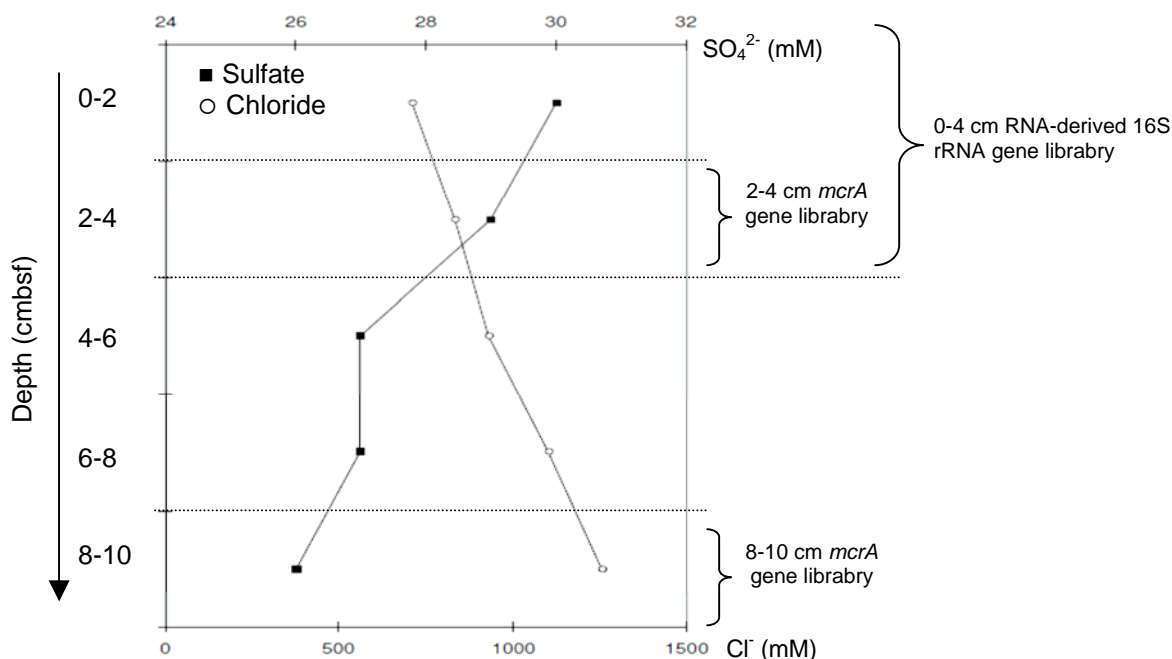


Figure 2: Sulfate and chloride porewater concentration profiles for core CT-21 of the Napoli orange mat sediments.

The sulfate porewater concentrations in shallow sediments are higher than conventional concentrations in the seawater column, and then show a decrease with depth (Fig. 2). The possible sulfur-oxidizing bacteria composing the microbial mat produce sulfate, which could explain the high sulfate concentrations at the water-sediment interface. The decrease of sulfate concentrations with depth could indicate sulfate reduction. Indeed sediments associated with orange-pigmented microbial mats have been showed to host high rates of sulfate reduction due to the large amount of sulfate produced by the microbial mat sulfur-oxidizing bacteria (Mills *et al.*, 2004; Omoregie *et al.*, 2008). In our study, the bacterial filaments penetrate the first few sediments centimetres and could therefore diffuse sulfate into the deeper sediment layers, further adding to the sulfate pool and thus enhancing sulfate-reduction processes. Hence, the sulfate to methane transition zone does not seem to be reached in these 10 first cmbsf layers.

Archaeal pattern distribution with depth.

The DGGE fingerprints (Fig. 3A) generated from DNA samples extracted from sediment layers associated with orange-pigmented microbial mats of the Napoli mud volcano displayed a complex and diverse distribution of the archaeal communities. The DGGE pattern was analyzed by statistical clustering. The resulting dendrogram (Fig. 3B) of the DGGE pattern highlighted 2 separate clusters. The first cluster grouped depths 0 to 4 cmbsf, and the second one 4 to 10 cmbsf sediment layers, suggesting a change with depth in archaeal populations with depth. The second cluster regrouping depths 4 to 10 cmbsf also show a subclustering differentiating sections 4-6 and 6 to 10 cmbsf. This shift could be linked to the penetrations of microbial filaments belonging to the orange mat. Indeed, these filaments penetrated the first three centimetres of the sediment layers and could have oxygenated the sediments, hence influencing activities and diversity of the archaeal community.

Metabolically active archaeal community of the shallow sediment layers.

According to the archaeal DGGE pattern, we constructed RNA-derived 16S rRNA gene libraries for depths suggesting a shift in the archaeal community diversity, i.e. 0-4 and 4-10 cmbsf. Only RNA extracted from the 0-4 section from the Napoli sediments underlying orange-pigmented microbial mats yielded enough quantity (7,9 ng/ μ L) for retrotranscription and amplification of the archaeal 16S rRNA genes to be efficient. A total of 41 archaeal RNA-derived 16S rRNA gene sequences were analysed for the 0-4 cmbsf section. Rarefaction curves generated for the RNA-derived 16S rRNA genes indicated saturation (Supplementary material. SM1), while percent coverage was determined to be 78 %. With the 85 % defined similarity level, coverage analysis suggests that the full diversity of archaeal 16S rRNA sequences was not exhausted and that a greater diversity remains to be detected within these sediments. Two major metabolically active phylotypes belonging to archaeal uncultured groups were detected in the shallow sediment layers (Fig. 4): MBG-D and Rice Cluster V (RC-V). The other minor groups that were detected also belong to uncultured archaeal lineages (Fig. 4), i.e. DHVE group 4 (DHVE-4), Group VI, MCG and one clone (NapMat-0_4-rtC09) that was not related to any known group (Supplementary material. SM2).

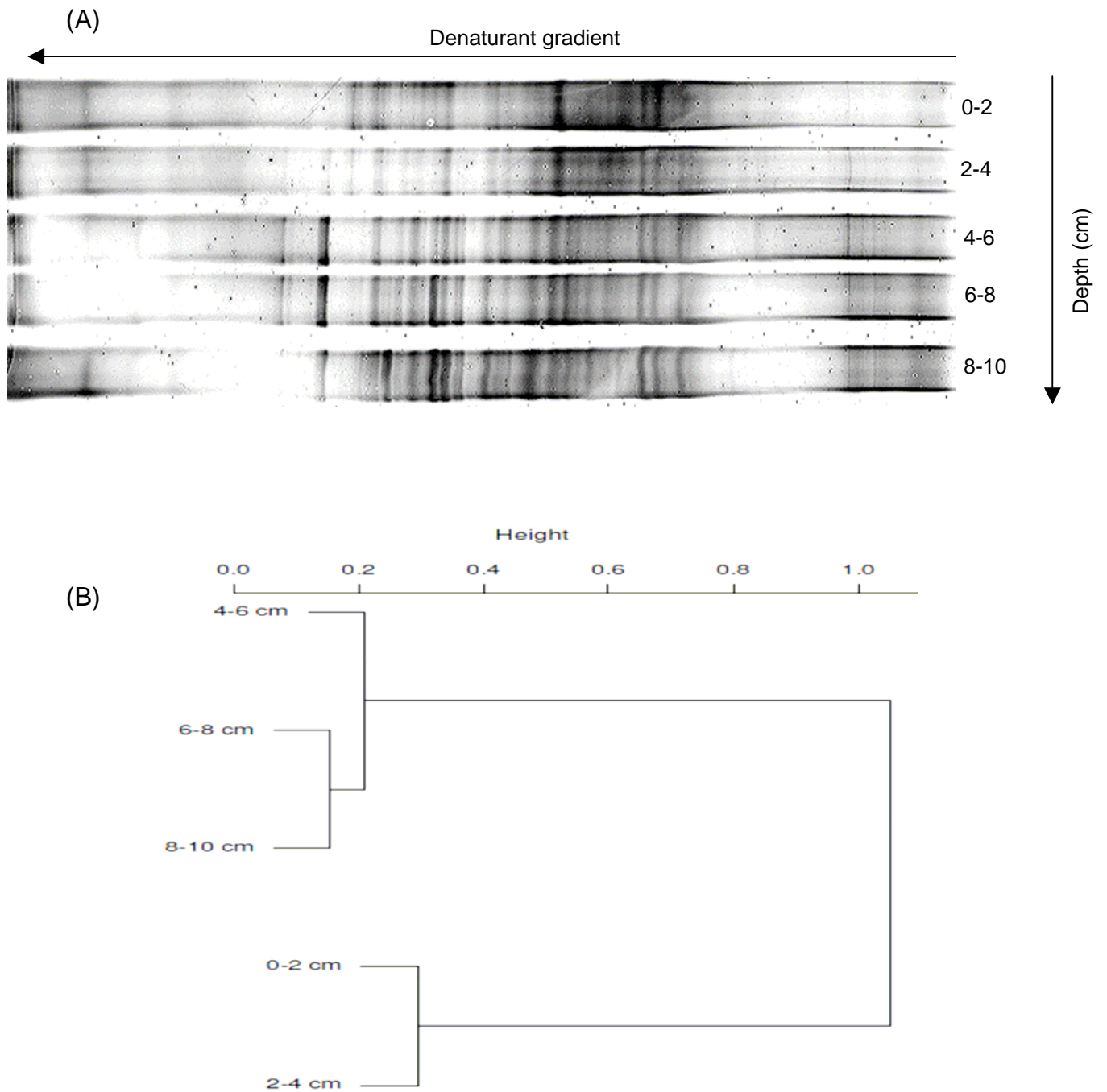


Figure 3: A) DGGE analysis of Archaeal 16S rRNA genes obtained by nested PCR from various sediment depths in the Napoli mud volcano. Marked DGGE bands were excised and sequenced. Numbers B1 to B7 are bands corresponding to NapMat-dggeB1 to NapMat-dggeB7. B) Dendrogram obtained from clustering analysis of DGGE banding profiles and scoring bands as present or absent, using the R software. Bar indicates dissimilarity values.

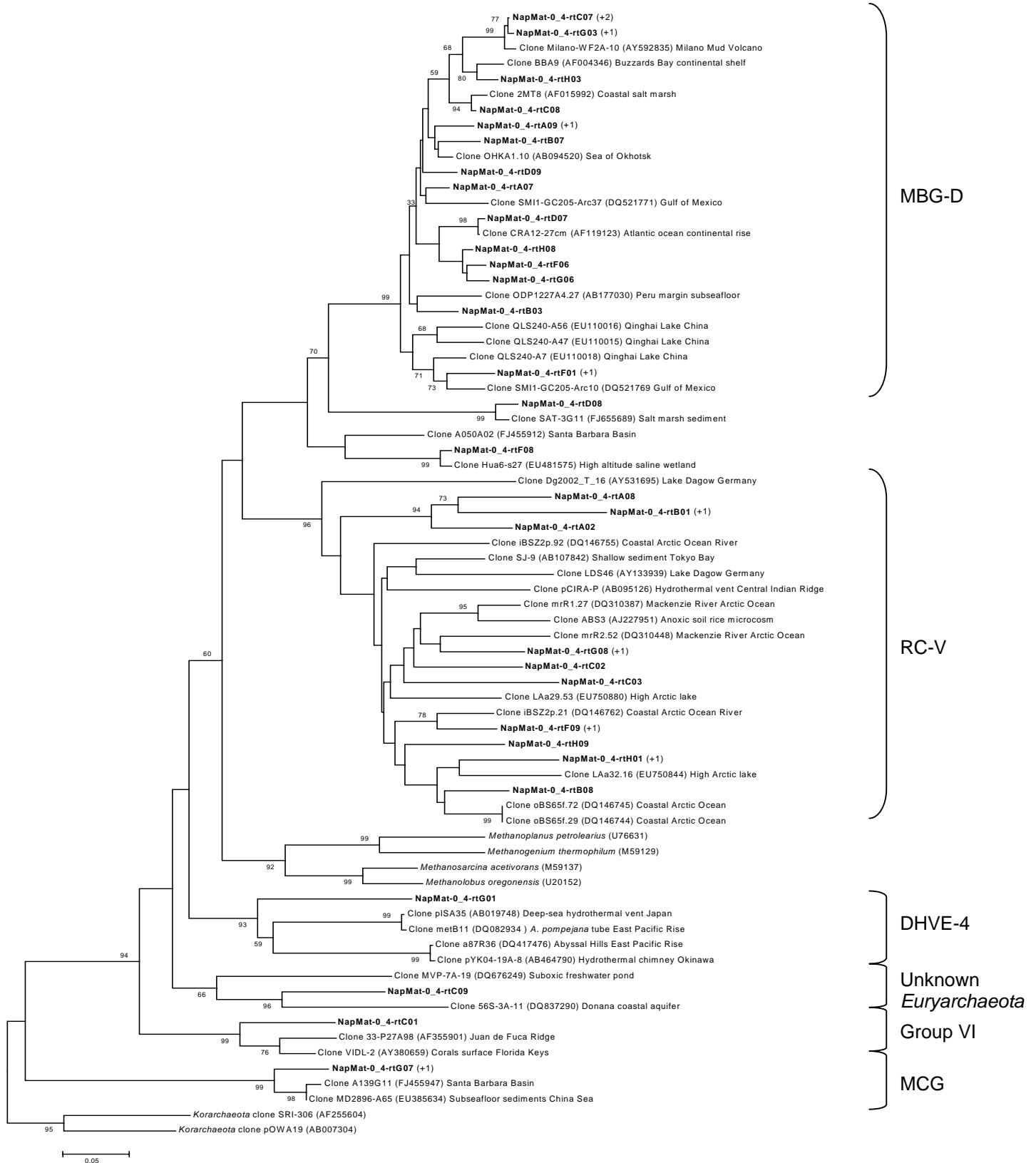


Figure 4: Phylogenetic tree of the archaeal RNA-derived 16S rRNA genes of the Napoli mud volcano based on the neighbour-joining method with 575 homologous positions. Bootstrap values (in percent) are based on 1000 replicates and are indicated at nodes for branches values $\geq 50\%$ bootstrap support. Gene sequences recovered in this study from Napoli sediments are in boldface type. The scale bar indicates five substitutions per 100 nucleotides. RC-V, Rice Cluster V, MBG-D, Marine Benthic Group D, DHVE-4, Deep Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 4, MCG, Miscellaneous Crenarchaeotic Group.

Unexpected RC-C members were metabolically active in the 0-4 cmbsf sediments underlying orange-pigmented mats. The RC-V was first discovered in an anoxic flooded rice paddy soil (Grosskopf *et al.*, 1998). The intralinear levels of rDNA similarity of the RC-V sequences were low highlighting that this group seems to be phylogenetically very diverse. This could suggest diverse metabolic activities and physiologies. RC-V were observed in cold coastal waters of the Mackenzie River in northwestern Canada rich in suspended particles (Galand *et al.*, 2006). It was suggested that RC-V were linked to detrital decomposition. The Napoli sediment layers in which the RC-V were detected had a high organic matter content (data not shown), which could support this hypothesis. The RC-V were also found in freshwater sediments, where methanogenesis is known to take place (Zepp Falz *et al.*, 1999; Glissmann *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009). This study is the first to report occurrence of metabolically active members of the RC-V in hypersaline sediments in the Napoli mud volcano. The MBG-D were detected in many saline or hypersaline environments (Benlloch *et al.*, 2002; Sørensen *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008; Omoregie *et al.*, 2008). Jiang *et al.* propose that saline and alkaline conditions, among other unknown factors, could play a role in controlling the distribution of marine benthic groups, such as the MBG-D. Hence, the hypersaline sediments of the Napoli mud volcano could explain the presence of members of the MBG-D.

Diversity and distribution of the ANME.

To expand our understanding of the methanogenic and methanotrophic communities in the Napoli sediments covered by orange-pigmented, *mcrA* gene libraries were constructed for representative sediment depths suggesting a significant shift in the archaeal composition, i.e. 0-4 and 4-10 cmbsf. Amplification of *mcrA* genes for the 0-2 section was not successful despite many attempts to optimize the PCR conditions. This could be explained by penetration of orange filaments belonging to the microbial mat in the first three centimetres of the sediment layers. Indeed the filaments could have oxygenated these layers, explaining absence of detection of ANME affiliated sequences. Hence, we constructed two *mcrA* gene libraries for the 2-4 and 8-10 cmbsf depth sections. A total of 32 *mcrA* sequences were analysed for the 2-4 cmbsf sediment section, while 44 for the 8-10 cmbsf layers (Fig. 5).

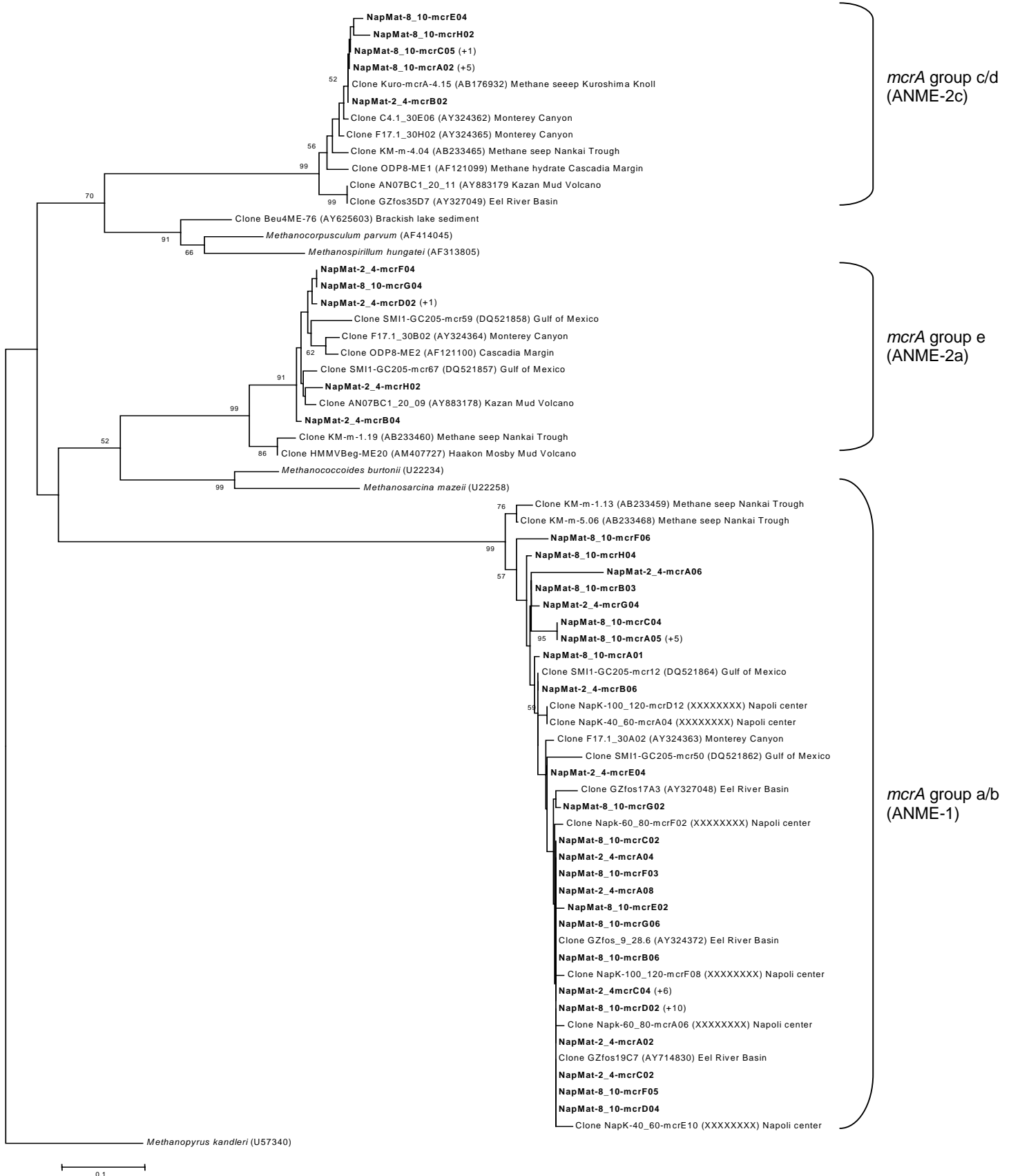


Figure 5: Phylogenetic analysis of MCR amino acid sequences from the Napoli sediments based on the neighbour-joining method with approximately 258 amino acid positions. Bootstrap values (in percent) are based on 1000 replicates and are indicated at nodes for branches values $\geq 50\%$ bootstrap support. Gene sequences from the Napoli sediments obtained in this study are in boldface type.

Rarefaction curves generated for the *mcrA* clones of the two libraries indicated saturation (Supplementary material. SM1), while percent coverage was determined to be 59% and 81,8% for the 2-4 and 8-10 cmbsf gene libraries respectively. Three *mcrA* phylotypes were present (Supplementary material. SM3), i.e. *mcrA* group a/b (ANME-1 as defined by Hallam *et al.*, (2003)), *mcrA* group c/d (ANME-2c) and *mcrA* group e (ANME-2a). The majority of the *mcrA* clones were related to the ANME-2a at 2-4 cmbsf, followed by the ANME-1. The ANME-2c sequences represented only a small portion of the presumed anaerobic methanotrophs. At the 8-10 cmbsf section, the ANME-1 became the dominant group, followed by the ANME-2c, and the ANME-2a represented only a small proportion of the presumed anaerobic methanotrophs.

Sediments underlying bacterial mats seem to constitute hot spots for AOM (Mills *et al.*, 2004), because microbial mats could trap methane in the sediments directly beneath them, locally increasing methane concentrations and preventing methane seepage (Lanoil *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2005). ANME have been assumed to carry out AOM, therefore it seems likely that AOM occurred in the sediments of the Napoli mud volcano.

ANME-2a have been found as the unique methanotrophic representative in sediments of the active center of Napoli (data not published), were dominant in marine sediments of Skagerrak (Parkes *et al.*, 2007), and in sediments covered with white-pigmented mats of the Gulf of Mexico (Mills *et al.*, 2004). It is possible that these ANME representative clusters are adapted to cold temperature and moderate fluid fluxes. Girguis *et al.* (Girguis *et al.*, 2005) reported that in higher flow regimes, ANME-1 could outgrow and outcompete ANME-2 for resources. Hence in our study, the dominance ANME-1 in the deeper sediment layers is consistent with these observations. Furthermore sediments underlying bacterial mats could accumulate and concentrate methane, suggesting that the Napoli ANME-2 members could be adapted to high methane concentrations, and moderate fluid fluxes. Some authors suggest that ANME-2 may be more active at low temperatures compared to ANME-1 (Nauhaus *et al.*, 2005). Also ANME-1 may be more sensitive to oxygen than ANME-2 (Knittel *et al.*, 2005). Therefore, the distribution of the ANME-2 in the Napoli mud volcano sediments tends to support these observations.

Culturable methanogenic diversity.

Methane production was detected in media designed to enrich methylotrophic methanogens (TMA) in the shallow sulfate-rich 0-2, and 2-4 cmbsf sediment sections. Microscopic observations of positive enrichments from the H₂ medium suggest that methanogens were cocci. Under UV light, autofluorescent methanogens were detected as free cells. Total DNA was extracted from the TMA enriched medium of the 0-2 and 2-4 cmbsf sections. Phylogenetic affiliation of clone NapMat-0_2-enr30 showed 99 % sequence similarity with clone Tommo05_1274_3_Arch90 of the *Euryarchaeota* (FM179838) recovered from the Tommeliten methane seep, in the North Sea (Wegener *et al.*, 2008), and 98 % of sequence similarity with the closest cultured methanogen *Methanococcoides methylutens* (M59127). Phylogenetic affiliation of clone NapMat-2_4-enr31 showed 98 % sequence similarity with the cultured methanogen *Methanococcoides burtonii* (CP000300). These results are in agreement with previous studies detecting methylotrophic *Methanococcoides*-type methanogens in saline or hypersaline habitats such as marine sediments in Skan Bay (Kendall *et al.*, 2007), anaerobic sediments of mangroves (Lyimo *et al.*, 2000; Lyimo *et al.*, 2009), and recently in sediments of the center of the Napoli mud volcano (unpublished data). Methylotrophic methanogens could take up methylated compounds as substrates that are not used by other competitive microorganisms such as sulfate-reducing bacteria. Moreover, methylated compounds could derive from organic detritus from the microbial mat. And, methylotrophic methanogens have been shown to efficiently tolerate high salinity environments (Oren, 1999).

In this study, no known halophilic or halotolerant *Archaea* were detected, despite the high measured chloride concentrations. The same observation was reported for brines from the Gulf of Mexico (Joye *et al.*, 2009). However, as most of the sequences detected; i.e. DHVE4, MBG-D, MCG, RC-V, ANME, belong to as yet uncultured archaeal lineages, we can assume that some of the Napoli sequences represent unknown halophilic or halotolerant microorganisms. This assumption is supported by the fact that many MBG-D or ANME-1 sequences were found in hypersaline habitats.

Conclusion.

In this study, culture-independent techniques were employed in order to assess the distribution of active archaeal communities in sediments associated with orange-pigmented mats of the brine impacted Napoli mud volcano. In the shallow sulfate-rich sediment layers of the Napoli mud volcano, active fraction of the archaeal community based RNA-derived 16S rRNA genes were mainly represented by sequences belonging to as yet uncultured lineages. Finally, *mcrA* gene libraries and sulfate porewater concentrations suggest that active AOM took place in the Napoli mud volcano sediments. And enrichment cultures suggest that active methanogens were present in the shallow sulfate-rich sediment layers. Therefore, a complex archaeal community was found in this hypersaline habitat, intertwining sulfur and methane cycles.

Acknowledgements.

We would like to thank Josée Sarrazin and Catherine Pierre, the chief scientists of the MEDECO cruise, the ROV team, the officers and crew of the RV *Pourquoi Pas?* as well as the shipboard scientific community for their help at sea. This work was funded by the HERMES project and the ANR Deep Oasis.

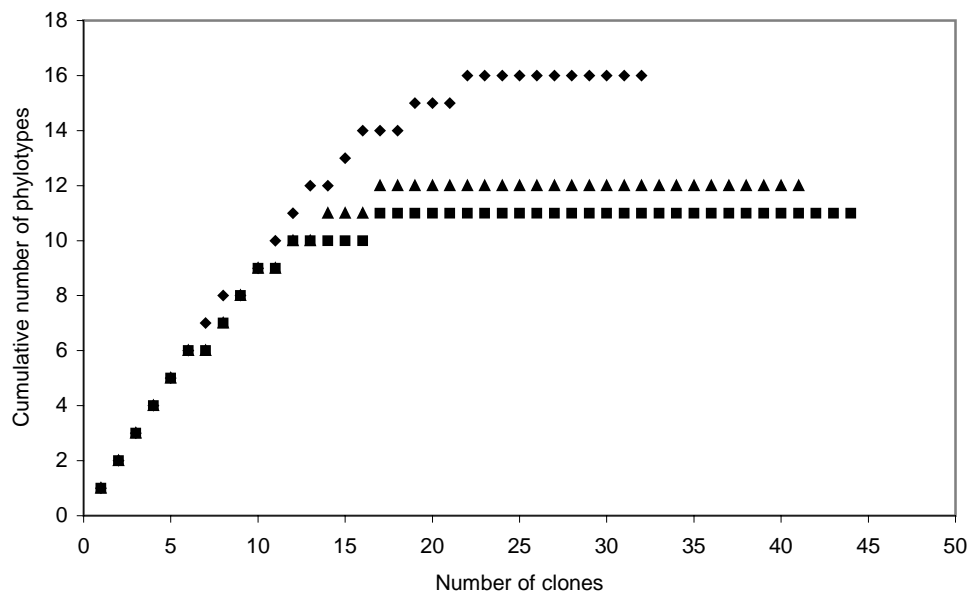
REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Aloisi, G, Pierre, C, Rouchy, J-M, Foucher, J-P, & Woodside, J (2000). Methane-related authigenic carbonates of eastern Mediterranean Sea mud volcanoes and their possible relation to gas hydrate destabilisation. *Earth. Planet. Sci. Lett.* **184**:321-338.
- Balch, W.E., and Wolfe, R.S. (1976) New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 781-791.
- Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E.O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F.L. *et al.* (2002) Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**: 349-360.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., and Gieske, A. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Baneras, L., Salio, C.P., and Muyzer, G. (2000) Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 499-508.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V.J. *et al.* (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**: 338-348.
- Chan, O.C., Claus, P., Casper, P., Ulrich, A., Lueders, T., and Conrad, R. (2005) Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ. Microbiol.* **7**: 1139-1149.
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Zitter, T., Roy, N., Jean-Baptiste, P., Foucher, J.P. *et al.* (2003) Evidence of methane venting and geochemistry of brines on mud volcanoes of the eastern Mediterranean Sea. *Deep-sea research Part I* **50**: 941-958.
- Dählmann, A., and de Lange, G.J. (2003) Fluid-sediment interactions at Eastern Mediterranean mud volcanoes: a stable isotope study from ODP Leg 160. *Earth Planet. Sci. Lett.* **212**: 377-391.

- Fry, J.C., Webster, G., Cragg, B.A., Weightman, A.J., and Parkes, R.J. (2006) Analysis of DGGE profiles to explore the relationship between prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 86-98.
- Galand, P.E., Lovejoy, C., and Vincent, W.F. (2006) Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **44**: 115-126.
- Girguis, P.R., E, C.A., and DeLong, E.F. (2005) Growth and Population Dynamics of Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous-Flow Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3725-3733.
- Glissmann, K., Chin, K.-J., Casper, P., and Conrad, R. (2004) Methanogenic Pathway and Archaeal Community Structure in the Sediment of Eutrophic Lake Dagow: Effect of Temperature. *Microb. Ecol.* **48**: 389-399.
- Grosskopf, R., Stubner, S., and Liesack, W. (1998) Novel Euryarchaeotal Lineages Detected on Rice Roots and in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4983-4989.
- Haese, R.R., Hensen, C., and de Lange, G.J. (2006) Pore water geochemistry of eastern Mediterranean mud volcanoes: Implications for fluid transport and fluid origin. *Mar. Geol.* **225**: 191-208.
- Hales, B.A., C, E., Titchie, D.A., Hall, G., W, P.R., and R, S.J. (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 668-675.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5483-5491.
- Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**: 1457-1462.
- Heijs, S.K., Sinninghe Damsté, J.S., and Forney, L.J. (2005) Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 47-56.
- Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Ye, Q., Shen, J., Rowe, H., and Zhang, C. (2008) Dominance of putative marine benthic Archaea in Qinghai Lake, north-western China. *Environ. Microbiol.* **10**: 2355-2367.
- Joye, S.B., Boetius, A., Orcutt, B.N., Montoya, J.P., Schulz, H.N., Erickson, M.J., and Lugo, S.K. (2004) The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps. *Chem. Geol.* **205**: 219-238.
- Joye, S.B., Samarkin, V.A., Orcutt, B.N., MacDonald, I.R., Hinrichs, K.-U., Elvert, M. *et al.* (2009) Metabolic variability in seafloor brines revealed by carbon and sulphur dynamics. *Nature Geoscience* **2**: 349-354.
- Kendall, M.M., Wardlaw, G.D., Tang, C.F., Bonin, A.S., Liu, Y., and Valentine, D.L. (2007) Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 407-414.
- Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic Archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 467-479.
- Krüger, M., Meyerdierks, A., Glöckner, F.O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M. *et al.* (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**: 878-881.
- Lanoil, B.D., La Duc, M.T., Wright, M., Kastner, M., Nealson, K.H., and Bartlett, D. (2005) Archaeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 167-177.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H. *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Lloyd, K.G., Lapham, L., and Teske, A. (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b Archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7218-7230.
- Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3348-3362.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., and Riley, P.W. (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**: 3521-3530.
- Lyimo, T.J., Pol, A., Jetten, M.S.M., and Op den Camp, H.J.M. (2009) Diversity of methanogenic archaea in a mangrove sediment and isolation of a new *Methanococcoides* strain. *FEMS Microbiol. Ecol.* **291**: 247-253.
- Lyimo, T.J., Pol, A., Op den Camp, H.J.M., Harhangi, H.R., and Vogels, G.D. (2000) *Methanosarcina semesiae* sp. nov., a dimethylsulfide-utilizing methanogen from mangrove sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 171-178.
- 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.
- Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M. *et al.* (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**: 1013-1015.

- Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., and Sobczyk, P.A. (2004) Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with Beggiatoa species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5447-5458.
- Nauhaus, K., Treude, T., Boetius, A., and Krüger, M. (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environ. Microbiol.* **7**: 98-106.
- Niemann, H., Elvert, M., Hovland, M., Orcutt, B., Judd, A., Suck, I. *et al.* (2005) Methane emission and consumption at a North Sea gas seep (Tommeliten area). *Biogeosciences* **2**: 335-351.
- Nikolaus, R., Ammerman, J.W., and MacDonald, I.R. (2003) Distinct pigmentation and trophic modes in Beggiatoa from hydrocarbon seeps in the Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.* **32**: 85-93.
- Omeregge, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Røy, H. *et al.* (2008) Biogeochemistry and Community Composition of Iron- and Sulfur-Precipitating Microbial Mats at the Chefred Mud Volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3198-3215.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 334-348.
- Otte, S., Kuenen, J.G., Nielsen, L.P., Paerl, H.W., Zopfi, J., Schulz, H.N. *et al.* (1996) Nitrogen, Carbon, and Sulfur Metabolism in Natural Thioploca Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3148-3157.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F.L., and Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3367-3373.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A., Banning, N., Brock, F., Webster, G., Fry, J.C. *et al.* (2007) Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ. Microbiol.* **9**: 1146-1161.
- R Development Core, T. (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L., and Whitman, W.B. (2001) Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4374-4376.
- Sørensen, K.B., Canfield, D.E., Teske, A.P., and Oren, A. (2005) Community Composition of a Hypersaline Endoevaporitic Microbial Mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7352-7365.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Thauer, R.K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Toffin, L., Webster, G., Weightman, A.J., Fry, J.C., and Prieur, D. (2004) Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 357-367.
- Vetriani, C., Jannasch, H.W., J, M.B., Stahl, D.A., and Reysenbach, A.-L. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4375-4384.
- Wegener, G., Shovitri, M., Knittel, K., Niemann, H., Hovland, M., and Boetius, A. (2008) Biogeochemical processes and microbial diversity of the Gullfaks and Tommeliten methane seeps (Northern North Sea). *Biogeosciences* **5**: 1127-1144.
- Wu, L., Ma, K., Li, Q., Ke, X., and Lu, Y. (2009) Composition of Archaeal Community in a Paddy Field as Affected by Rice Cultivar and N Fertilizer. *Microb. Ecol.* **58**: 819-826.
- Zepp Falz, K., Holliger, C., Grosskopf, R., Liesack, W., Nozhevnikova, A.N., Müller, B. *et al.* (1999) Vertical Distribution of Methanogens in the Anoxic Sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2402-2408.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 316-322.
- Zitter, T.A.C., Huguen, C., and Woodside, J.M. (2005) Geology of mud volcanoes in the eastern Mediterranean from combined sidescan sonar and submersible surveys. *Deep-sea research Part I* **52**: 457-475.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



SM1: Rarefaction analysis of the *mcrA* and RNA-derived 16S rRNA gene libraries, done using the RarFac programm. ▲ 0-4 cmbfs RNA-derived 16S rRNA gene library, ◆ 2-4 cmbfs *mcrA* gene library, and ■ 8-10 cmbfs *mcrA* gene library.

Phylogenetic affiliation	Clone	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)	
<i>Euryarchaeota</i> RC-V	NapMat-0_4-rtA02	LAa32.16 (EU750844)	93	
	NapMat-0_4-rtA08	Two meromictic High Arctic lakes LAa32.16 (EU750844)	90	
	NapMat-0_4-rtB01	Two meromictic High Arctic lakes oBS65f.72 (DQ146745)	92	
	NapMat-0_4-rtB08	Large arctic river and the coastal Arctic Ocean LAa32.16 (EU750844)	90	
	NapMat-0_4-rtC02	Two meromictic High Arctic lakes a87R6 (DQ417462)	88	
	NapMat-0_4-rtC03	Ridge Flank Abyssal Hills sea floor, East Pacific Rise LAa29.53 (EU750880)	87	
	NapMat-0_4-rtF05	Two meromictic High Arctic lakes iBSZ2p.21 (DQ146762)	96	
	NapMat-0_4-rtF07	Large arctic river and the coastal Arctic Ocean iBSZ2p.21 (DQ146762)	95	
	NapMat-0_4-rtF09	Large arctic river and the coastal Arctic Ocean iBSZ2p.21 (DQ146762)	95	
	NapMat-0_4-rtG08	Large arctic river and the coastal Arctic Ocean a87R41 (DQ417474)	91	
	NapMat-0_4-rtH01	Ridge Flank Abyssal Hills sea floor, East Pacific Rise oBS65f.29 (DQ146744)	89	
	NapMat-0_4-rtH09	Large arctic river and the coastal Arctic Ocean LDS7 (AY133925)	90	
	MBG-D	NapMat-0_4-rtA07	Sediment of eutrophic Lake Dagow OHKA1.10 (AB094520)	97
		NapMat-0_4-rtA09	Coastal subseafloor sediments from the sea of Okhotsk A050A02 (FJ455912)	96
NapMat-0_4-rtB03		Sulfate-methane transition zone in continental margin sediments, Santa Barbara Basin, California A050A02 (FJ455912)	97	
NapMat-0_4-rtB07		Sulfate-methane transition zone in continental margin sediments, Santa Barbara Basin, California A050A02 (FJ455912)	97	
NapMat-0_4-rtC07		Sulfate-methane transition zone in continental margin sediments, Santa Barbara Basin, California WF2A-10 (AY592835)	99	
NapMat-0_4-rtC08		Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea OHKA1.10 (AB094520)	98	
NapMat-0_4-rtD07		Coastal subseafloor sediments from the sea of Okhotsk CRA12-27cm (AF119123)	99	
NapMat-0_4-rtD09		Deep-sea sediments, NW Atlantic Ocean Continental Rise A050A02 (FJ455912)	97	
NapMat-0_4-rtF01		Sulfate-methane transition zone in continental margin sediments, Santa Barbara Basin, California SMI1-GC205-Arc10 (DQ521769)	97	
NapMat-0_4-rtF06		Hypersaline Sediments, Gulf of Mexico ED1-23 (EU332095)	95	
NapMat-0_4-rtG03		Marine sediments WF2A-10 (AY592835)	99	
NapMat-0_4-rtG06		Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea OHKA1.30 (AB094520)	97	
NapMat-0_4-rtH03		Coastal subseafloor sediments from the sea of Okhotsk HydCal69 (AJ578091)	96	
NapMat-0_4-rtH08		Marine sediments above gas hydrate ED1-23 (EU332095)	99	
MBG-D related	NapMat-0_4-rtD08	Marine sediments SAT_3G11 (FJ655689)	98	
	NapMat-0_4-rtF08	Salt marsh sediments Hua6-s27 (EU481575)	99	
Group VI	NapMat-0_4-rtC01	Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile VIDL-2 (AY380659)	87	
DHVE4	NapMat-0_4-rtG01	Surface microlayer of coral <i>Montastraea annularis</i> complex pYK04-19A-8 (AB464790)	84	
		Chimney structure at hydrothermal active area in the Yonaguni Knoll IV, Southern Okinawa Trough MVP-7A-19 (DQ676249)		
Unknown <i>Euryarchaeota</i>	NapMat-0_4-rtC09	Suboxic freshwater pond	82	
<i>Crenarchaeota</i> MCG	NapMat-0_4-rtG07	A139G11 (FJ455947)	94	
		Santa Barbara Basin		

SM2: Closest relatives of representative clones from the RNA-derived 16S rRNA gene library from depths 0 to 4 cmbsf of the Napoli sediments.

Phylogenetic affiliation	Clone	Nearest relative Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)	
<i>mcrA</i> group a/b	Nap-2_4-mcrA02	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	96	
	Nap-2_4-mcrA04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95	
	Nap-2_4-mcrA06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92	
	Nap-2_4-mcrA08	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	94	
	Nap-2_4-mcrB06	SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments	92	
	Nap-2_4-mcrC02	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95	
	Nap-2_4-mcrC04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	96	
	Nap-2_4-mcrE04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93	
	Nap-2_4-mcrF10	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93	
	Nap-2_4-mcrG04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93	
	Nap-8_10-mcrA01	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92	
	Nap-8_10-mcrA05	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93	
	Nap-8_10-mcrB03	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95	
	Nap-8_10-mcrB06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95	
	Nap-8_10-mcrC02	GZfos_9_28.6 (AY324372) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	98	
	Nap-8_10-mcrC04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93	
	Nap-8_10-mcrD02	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	96	
	Nap-8_10-mcrD04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	96	
	Nap-8_10-mcrE02	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	96	
	Nap-8_10-mcrF03	GZfos_9_28.6 (AY324372) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	98	
	Nap-8_10-mcrF05	GZfos_9_28.6 (AY324372) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	98	
	Nap-8_10-mcrF06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	86	
	Nap-8_10-mcrG02	SMI1-GC205-mcr12 (DQ521864) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments	95	
	Nap-8_10-mcrG06	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95	
	Nap-8_10-mcrH04	F17.1_30A02 (AY324363) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	92	
	<i>mcrA</i> group e	Nap-2_4-mcrB04	F17.1_30B02 (AY324364) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95
		Nap-2_4-mcrC08	F17.1_30B02 (AY324364) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95
		Nap-2_4-mcrD02	F17.1_30B02 (AY324364) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	96
		Nap-2_4-mcrD10	F17.1_30B02 (AY324364) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	90
		Nap-2_4-mcrD12	F17.1_30B02 (AY324364) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	93
		Nap-2_4-mcrE10	SMI1-GC205-mcr59 (DQ521858) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments	96
		Nap-2_4-mcrE12	SMI1-GC205-mcr59 (DQ521858) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments	93
Nap-2_4-mcrF04		SMI1-GC205-mcr67 (DQ521857) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments		
Nap-2_4-mcrF08		SMI1-GC205-mcr59 (DQ521858) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments	93	
Nap-2_4-mcrG02		F17.1_30B02 (AY324364) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95	
Nap-2_4-mcrG08		F17.1_30B02 (AY324364) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	95	
Nap-2_4-mcrH02		SMI1-GC205-mcr67 (DQ521857) Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	94	

<i>mcrA</i> group c/d	Nap-2_4-mcrH12	Hypersaline Gulf of Mexico Sediments F17.1_30B02 (AY324364)	92
	Nap-8_10-mcrG04	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon SMI1-GC205-mcr67 (DQ521857)	94
	Nap-2_4-mcrB02	Hypersaline Gulf of Mexico Sediments C4.1_30E06 (AY324362)	96
	Nap-8_10-mcrA02	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon C4.1_30E06 (AY324362)	96
	Nap-8_10-mcrA03	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon C4.1_30E06 (AY324362)	98
	Nap-8_10-mcrC05	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon C4.1_30E06 (AY324362)	97
	Nap-8_10-mcrE04	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon C4.1_30E06 (AY324362)	96
	Nap-8_10-mcrE05	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon C4.1_30E06 (AY324362)	88
	Nap-8_10-mcrG03	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon KM-m-4.04 (AB233465)	97
	Nap-8_10-mcrH01	Methane seep, Nankai Trough C4.1_30E06 (AY324362)	92
	Nap-8_10-mcrH02	Microcosm Enrichment, Monterey Canyon C4.1_30E06 (AY324362)	96
		Microcosm Enrichment, Monterey Canyon	

SM3: Closest relatives of representative clones from *mcrA* gene libraries from sections 2 to 4 cmbsf and 8 to 10 cmbsf, of the Napoli sediments.

CHAPITRE 3

**Etude de la distribution des communautés d'ANME
métaboliquement actives et de SRB dans les
sediments d'un pockmark en Mer de Norvège**

Préambule

Les communautés microbiennes des sédiments associés à des tapis de bactéries filamenteuses sont souvent dominées par des activités d'AOM couplées à la sulfato-réduction. Les pockmarks sont une structure géologique typique des zones d'émissions de fluides froids, et sont liés à des émissions de fluides au travers de conduits (cheminées à gaz) acheminant le méthane à la surface. Les communautés associées aux sédiments de pockmarks ont été, à notre connaissance, peu étudiées jusqu'alors dans les marges continentales. En raison de la singularité des ces structures géologiques de fonds de mer, nous nous sommes posés les questions suivantes: (i) existe-t-il des communautés microbiennes d'ANME et de sulfato-réductrices (SRB) dans des sédiments de pockmarks ?, (ii) quelle est la diversité et la distribution des communautés *Archaea* méthanotrophes anaérobies et SRB ?, et (iii) les communautés microbiennes probablement impliquées dans les processus d'AOM sont-elles comparables ou significativement différentes des communautés d'AOM rencontrées dans des sédiments de volcans de boue, de subsurface, ou encore d'autres écosystèmes abritant ce type de processus ?

Dans le but d'étudier la diversité des communautés microbiennes dans des sédiments de pockmark, nous avons échantillonné des sédiments associés à un tapis microbien de couleur marron-vert du pockmark G11 de la zone Nyegga, en Mer de Norvège. Ce pockmark est associé à des flux de fluides modérés, émettant probablement du méthane. De la faune ainsi que des croûtes carbonatées sont associées à ce pockmark, suggérant que les flux de fluides seraient plus modérés que dans les sédiments associés aux tapis de couleur orange du volcan de boue Napoli (Chapitre 2).

La distribution des communautés *Archaea* a été déterminée par la méthode de PCR-DGGE. La fraction des *Archaea* métaboliquement actives a été analysée grâce à la construction d'une banque de clones basée sur les gènes codant l'ARNr 16S dérivés d'extraits d'ARN. Les gènes métaboliques spécifiques *mcrA* et *dsrB* ont été étudiés pour mettre en évidence des communautés d'ANME (et méthanogènes) et de SRB.

Distribution of metabolically active anaerobic methane-oxidizing and sulfate-reducing microbial communities in the G11 Nyegga pockmark, Norwegian Sea

(in preparation)

Cassandra Sara Lazar, Julie Dinasquet, Stéphane L'Haridon, Patricia Pignet, Daniel Prieur, and Laurent Toffin

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, IFREMER Centre de Brest, Département Etudes des Environnements Profonds, Université de Bretagne Occidentale, BP70, 29280 Plouzané, France.

Correspondance : Laurent Toffin, Tel. : +33(0)2 98 22 43 96, Fax. +33(0) 98 22 47 57, e-mail: Laurent.toffin@ifremer.fr.

ABSTRACT

Pockmarks are seabed geological structures sustaining methane seepage in cold seeps. The G11 pockmark of the Nyegga area, Nordic Sea, is associated with carbonate rocks, macrofauna and filamentous microbial mats, and probably is an area of active fluid flow system. As microbial processes in pockmark structures are not thoroughly characterized, the metabolically active fraction of the archaeal community, as well as ANME and SRB communities were analyzed in sediments associated with a bacterial mat of the G11 pockmark. Vertical distribution of the Archaeal community assessed by PCR-DGGE highlighted presence of ANME-2 and methanogens in surface sediments, and ANME-1 in deeper sediments. Enrichment cultures detected presence of hydrogenotrophic methanogens of the *Methanogenium* in surface sediment layers as well. Analysis of the metabolically active portion of the archaeal community revealed that ANME-2 were present in the shallow sulfate-rich sediments. *mcrA* gene libraries showed that ANME-1 and ANME-3 appeared in the deeper sediments, but ANME-2 were still dominant in both surface and deeper layers. Finally, *dsrB* gene libraries detected a high SRB diversity, i.e. *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, *Syntrophobacteraceae*, *Desulfotomaculum*, in the shallow sulfate-rich sediments. This SRB diversity decreased with depth with the *Desulfovibrionales* as dominant group in the deeper sediments. Overall, these results show that the microbial community in sediments associated with a pockmark probably mediate methane and sulfur cycling processes, harbouring classical cold seep ANME and SRB communities.

INTRODUCTION

Pockmarks are submarine depressions that may be formed by gas expulsion, or intense and sustained fluid seeping through the seabed. They can remain active, emitting gas over long periods of time by microseepage, or display periods of quiescence between eruptions (Dimitrov and Woodside, 2003). The Norwegian continental margin contains large pockmark fields on its seafloor, connected to subsurface chimney structures. A smaller pockmark field Nyegga, is situated on the NE flank of the Storegga Slide (Fig. 1A), known to host gas hydrates, in the mid-Norwegian margin at 600-800 m water depth. Nyegga is surmised to be a area of large regional fluid flow system associated with pipes and polygonal faults (Hovland *et al.*, 2005). Seismic investigations provided evidence for underlying gas chimneys associated with active or recent seeps and biological activity (Foucher *et al.*, 2009). This regions is comprised of morphologically complex pockmarks (Fig. 1B) (named, A, C, G8, and G11), containing chaotic heaps of large carbonate rocks and slabs (Hovland and Svensen, 2006). The G11 pockmark is the deepest of the studied pockmarks in the Nyegga region (Fig. 1C), containing small interior basins (Hovland *et al.*, 2005).

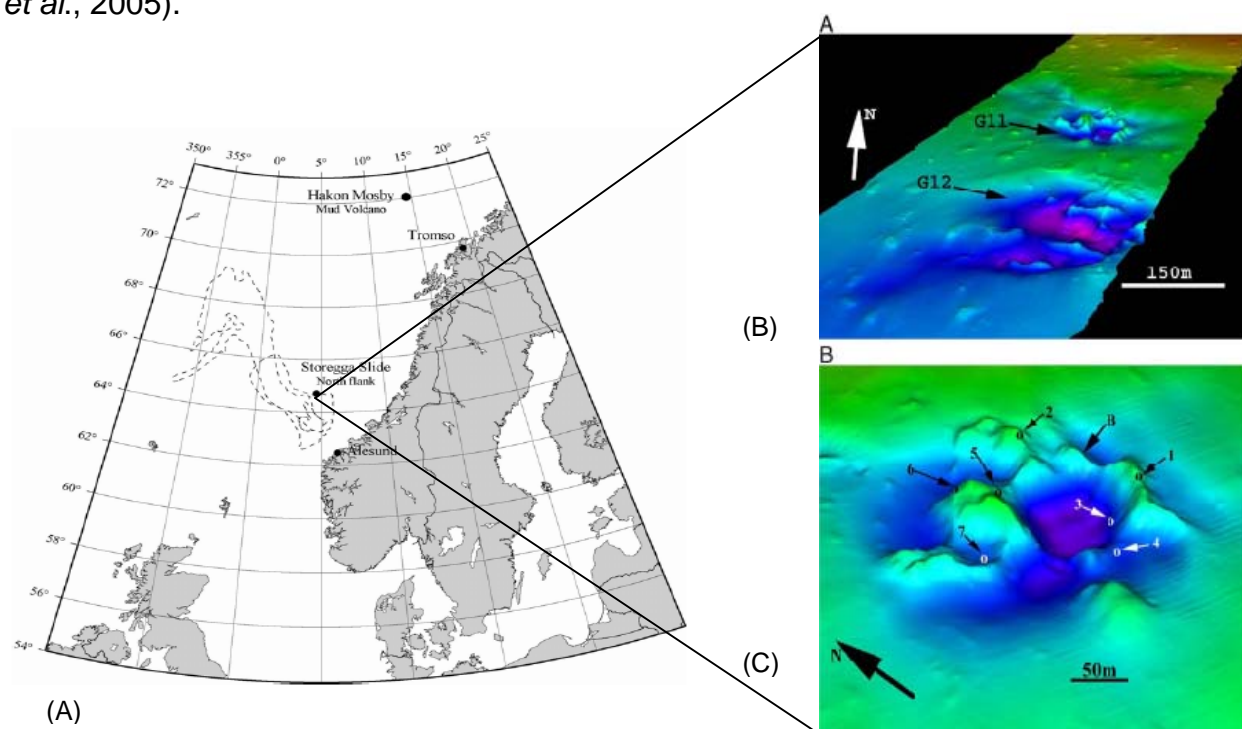


Figure 1: A) Map showing the location of the G11 Nyegga pockmark within the Storegga Slide. B) Oblique view of the G11 and G12 pockmarks (based on multibeam echosounder). C) Closer view of the G11 pockmark. From Hovland *et al.* (2006).

During their inspection of the pockmark, Hovland *et al.* (Hovland *et al.*, 2005) observed black sediments sometimes covered by filamentous bacterial mats, and macrofauna (gasteropode and pogonophora), probably sustaining a chemosynthetic-based ecosystem, supporting the hypothesis of active fluids flows through the pockmark. Hence, it seems likely that microseepage of methane is continuously and slowly flowing through the G11 pockmark. Mazzini *et al.* (Mazzini *et al.*, 2006) showed that methane-derived authigenic carbonates of the G11 pockmark were formed by anaerobic oxidation of methane (AOM), and that the precipitation took place in the shallow sediment depths of the sulfate-reducing zone. Recent observations reported that the rates of anaerobic methane oxidation in the sulfidic sediments of the innermost part of the pockmark reach up to $100 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, which is among the highest rates ever measured at cold seeps (Foucher *et al.*, 2009). Methane fuelling the carbonate precipitation seems to have mixed sources (thermogenic/biogenic) in G11 ($\delta^{13}\text{C}$ values between -29.4 and -58 ‰ V-PDB, (Hovland *et al.*, 2005; Mazzini *et al.*, 2006).

In cold seep ecosystems, AOM is a major sink of the greenhouse gas methane. AOM is driven by methanotrophic Archaea (ANME), and is sometimes coupled to sulfate reduction (SR) driven by sulfate-reducing bacteria (SRB). ANME are divided into three groups, ANME-1, ANME-2 and ANME-3. The ANME-1 are distantly affiliated with methanogenic clades of the *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales*, and the ANME-2 and ANME-3 with the *Methanosarcinales*. The presumably syntrophic ANME Archaea are usually associated in aggregates with sulfate-reducing partners of the *Desulfosarcina-Desulfococcales* and the *Desulfobulbaceae* (Boetius *et al.*, 2000; Knittel *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2006). The ANME members have not yet been obtained in pure culture, and the biochemical pathways of AOM remain unknown. However, hypothesis that the initial step in ethane oxidation is essentially a reversal of the terminal reaction of methanogenesis (Thauer, 1998), using a modified methyl coenzyme M reductase (MCR) enzyme (Hallam *et al.*, 2003; Krüger *et al.*, 2003; Hallam *et al.*, 2004) is assumed. SRB play a crucial role in the degradation of organic matter in many marine sulfate rich shallow sediments (Joulian *et al.*, 2001). They all share the ability to obtain energy from dissimilatory reduction of inorganic sulfate. They are widespread in anaerobic habitats and are composed of diverse physiological groups able to degrade a large range of organic substrates (Dhillon *et al.*, 2003).

Recently, AOM and SR activities were detected in sediments of pockmarks in the Nile Deep Sea Fan (Omorigie *et al.*, 2009), suggesting that AOM presumably coupled to SR could have occurred in these pockmark sediments. Also, ANME-1, 2 and 3 sequences (Cambon-Bonavita *et al.*, 2009), as well as specific ANME and SRB lipid biomarkers (Bouloubassi *et al.*, 2009), have been detected in the REGAB giant pockmark, in the southeast Atlantic. However, rates of fluid flow and related microbiological processes in pockmark structures are still not well understood (Hustoft *et al.*, 2009). In this study, we sought to analyze the diversity of anaerobic methanotrophs and sulfate-reducing communities in sediments of the G11 pockmark in Nyegga. Questions raised in this study were, (1) which are the key microorganisms mediating presumed AOM and SR processes ?, (2) are these microbial communities specific to pockmark habitats ?, and (3) how do pockmark fluid fluxes impact the diversity of these communities ?. Vertical composition of the archaeal community with depth was assessed by DGGE fingerprinting based on the 16S rRNA genes. The metabolically active fraction of the archaeal communities were examined. Total RNA was extracted from sediment depths 0 to 4 cmbsf, and subjected to reverse transcription-PCR, with specific archaeal primers. Then, microbial community structure of the ANME and SRB were monitored with sediment depth, by examining the *mcrA* and *dsrB* functional genes respectively.

MATERIALS AND METHODS

Sediment sampling, and porewater analysis.

The sediment core was collected from the Nyegga G11 pockmark (N 64°39.9925, E 005°17.3457) located in the Norwegian continental margin at the Storegga Slide off the western coast of Norway in May/June 2006 during the Ifremer Vicking cruise with the research vessel Pourquoi Pas?. The sediment sample was recovered during dive PL 272-02 05 by the VICTOR 6000 (Ifremer)-operated push core CT-22 from 732 meters of water depth. Brown greenish bacterial mats were observed in the Nyegga pockmarks region. The sampled bacterial mat was surrounded with sediments populated by black tubeworms. Immediately after retrieval, the sediment core was sectioned horizontally and aseptically in 2-cm-thick layers in the cold room (4°C), and then frozen at –80°C for nucleic acid extractions until analyzed.

Sediment porewater was obtained by centrifuging approximately 10 g of crude sediment, 15 minutes, 3 000 x g at 4°C and the supernatants were removed and

transferred to clean polypropylene vials. The porewater was then stored at -20° . Depth distribution of dissolved sulfate and chloride concentrations were measured using ion exchange chromatography, with a isocratic DX120 ion chromatography system (DIONEX Corporation, Sunnyvale, CA) fitted with Ionpac AS9-SC columns and a suppressor (ASRS-ultra II) unit in combination with a DS4-1 heated conductivity cell. Components were separated using a sodium carbonate gradient, with a flow of $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Culture media for enrichment of methanogens.

Enrichment were performed anaerobically in 50 mL vials according to Balch and Wolfe (1976). Medium 141 from the DSMZ were used with slight modifications : organic substrates were omitted except yeast extract with a concentration adjusted to 0.2 g L^{-1} . The medium was prepared and sterilized under 80 % N_2 and 20 % CO_2 gas atmosphere. In order to enrich CO_2 -reducing, acetoclastic and methylotrophic methanogens, three enrichment media supplemented with H_2 (200 kPa), acetate (10 mM), trimethylamine (TMA, 20 mM) were used. 1 g of sediment from the different sections of CT22 was inoculated into 9 mL of medium (pH 7), the suspension was mixed and serially diluted until 10^{-3} . The cultures were incubated at 15°C to mimic *in situ* conditions. Cultures were periodically checked for methane production for one year. The methane detection was performed directly in the headspace of vial cultures by a micro MTI M200 Gas Chromatograph equipped with MS-5A capillary column and Poraplot U capillary column. Positive enrichment dilutions of methanogens were monitored by PCR-DGGE. For dilutions showing one DGGE band on the fingerprint, 16S rRNA genes were amplified using the A8F and A1492R primers, cloned and sequenced as mentioned hereafter.

Nucleic acids (DNA and RNA) extraction and purification.

Total genomic DNA was directly extracted and purified from 5 g of wet sediment from all sections in duplicates, by using the Zhou *et al.* (1996) method with modifications. Sediment samples were mixed with DNA extraction buffer as described by Zhou *et al.*, and then frozen in liquid N_2 then thawed at a 65°C , 3 times. The pellet of crude nucleic acids obtained after centrifugation, was washed with cold 80% ethanol, and resuspended in sterile deionized water, to give a final volume of 100 μL . Crude DNA extracts were then purified using the Wizard DNA clean-up kit (Promega, Madison,

WI). DNA extracts were aliquoted and stored at -20°C until required for PCR amplification.

Total RNA was directly extracted and purified from 2g of wet sediment from pooled sediment sections 0 to 4 cmbsf, using the RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MO BIO Labs. Inc., Carlsbad, CA) according to manufacturer recommendations. Aliquots of RNA extracts were treated by Turbo DNase (Applied Biosystems, Foster City, CA) and purified using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocols. The quality of RNA samples was examined by agarose-gel electrophoresis and concentrations were determined using spectrophotometry (Nanodrop ND-100, NanoDrop Technologies Wilmington, DE, USA).

PCR-DGGE amplification of total DNA.

Archaeal 16S rRNA genes were amplified by PCR from purified DNA extracts using the Archaeal targeted primers pair 8F (5'-CGGTTGATCCTGCCGGA-3') and 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Casamayor *et al.*, 2000). All PCR reactions (total volume reaction 25 μL) contained 1 μL purified DNA template (1/25 dilution), 1 X PCR buffer (Promega, Madison, WI), 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer (Eurogentec) and 0.6 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI). Amplification was carried out using the GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 49°C for 1 min 30 s, and extension at 72°C for 2 min for 30 cycles. All the archaeal 16S rRNA gene PCR products were then re-amplified with primers 340F (5'-CCCTACGGGGYGCASCAG-3') (Vetriani *et al.*, 1999) containing a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3') at the 5' end and 519R (5'-TTACCGCGGCKGCTG-3') (Ovreas *et al.*, 1997). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 72°C to 62°C (touchdown $-0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{cycle}^{-1}$) for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 20 cycles, then denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 10 cycles.

To restrict contamination to a minimum, PCR experiments was carried out under aseptic conditions (Captair® bio, Erlab, Fisher Bioblock Scientific) using autoclaved and UV-treated plasticware and pipettes, and only sterile nuclease-free molecular grade water (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Positive (DNA extracted from pure

cultures) and negative (molecular grade water) controls were used in all PCR amplifications.

DGGE fingerprinting analysis, band excision and sequencing.

DGGE was carried out as described by Toffin *et al.* (2004) with some modifications. PCR products were separated by DGGE using the D-Gene™ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) on 8% (w/v) polyacrylamide gels (40% acrylamide/bis solution 37.5:1 Bio-Rad) with a gradient of denaturant between 20% and 60%. A denaturing gradient gel consists of [100% denaturant equals 7M urea and 40% (v/v) formamide]. Gels were poured with the aid of a 30 mL volume Gradient Mixer (Hofer SG30, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and prepared with 1 X TAE buffer (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Electrophoresis was carried out at 60°C, 200 V for 5 hours (with an initial electrophoresis for 15 min at 80 V) in 1 X TAE buffer. Polyacrylamid gels were stained with SYBRGold nucleic acid gel stain (Invitrogen, San Diego, CA) for 30 min, and viewed using the Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Individual DGGE bands of interest were excised and washed in sterile-nuclease free molecular grade water for 10 min. Bands were then air-dried and crushed in 10-20 µL molecular grade water and incubated overnight at 4°C. The supernatant (1µL) was used as template DNA in a nested PCR using primer set 340F and 519R. The PCR products of excised DGGE bands were sequenced with primer 519R, using an ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the Biogenouest plateform of Roscoff Marine laboratory (France).

Reverse transcription, PCR amplification and construction of RNA-derived 16S rRNA gene libraries.

Purified RNA extracted from the 0 to 4 cmbsf depth was used for reverse transcription. RNA-derived cDNA was synthesised by reverse transcription using the 16S rRNA archaeal targeted primer 915R (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3') (Casamayor *et al.*, 2002) and the Moloney Murine Leukaemia Virus reverse transcriptase (M-MuLV, MP Biomedicals, Irvine, CA) according to the manufacturer's protocol. Purified RNA was initially denatured by incubating at 65°C for 10 min, and 7,7 µM of 16S reverse primer 915R was added to the denatured RNA. The reaction mixture was incubated at 70 °C for 10 min. The reverse transcription reaction mixture

consisted of 100 to 200 ng of denatured RNA and 16S rRNA reverse primer 915R, 1 X M-MuLV buffer, 200 μ M of deoxynucleoside triphosphate mix, and 10 mM DTT (dithiothreitol). The reverse transcription reaction mix was incubated at 42°C for 2 min. A 200-unit aliquot of M-MuLV Reverse Transcriptase was added prior to a 80 min incubation at 42°C that resulted in the transcription of the RNA into complementary 16S ribosomal DNA (cDNA). The reverse transcriptase reaction was then stopped by heating the solution at 70°C during 15 minutes. The cDNA end product was used as a template for archaeal 16S based PCR using the following primers: 340F and 915R. The PCR amplification involved 20 cycles each consisting of 94°C for 1 min, 71°C to 61°C (touchdown $-1^{\circ}\text{C}\cdot\text{cycle}^{-1}$) for 1 min, and 72°C for 2 min. The purified RNA extracts that were not reverse transcribed were also amplified by PCR using the same primers, in order to monitor possible DNA contaminations of RNA templates. No contaminating DNA was detected in any of these reactions. PCR products were purified with the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and analyzed on 1% (w/v) agarose gels run in 1 X TAE buffer stained with ethidium bromide and then UV-illuminated. Purified PCR products were cloned into TOPO XL PCR Cloning Kit, and transformed into *Escherichia coli* TOP10 cells (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations.

PCR amplification, construction of *mcrA* and *dsrB* environmental gene libraries, and sequencing.

Purified DNA extracted from the 0 to 2, and 8 to 10 cmbsf depths subsamples were used for the construction of *mcrA* and *dsrB* gene libraries. The *mcrA* genes were amplified by PCR using the ME1 (5'-GCMATGCARATHGGWATGTC-3') and ME2 (5'-TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT-3') primers previously developed to specifically target methanogens and also anaerobic methanotrophs (Hales *et al.*, 1996). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 40 s, annealing at 50°C for 1'30 min, and extension at 72°C for 3 min, for 30 cycles. The *dsrB* genes were amplified by PCR using the *dsr1F* (5'-ACSCACTGGAAGCACG-3') and *dsr4R* (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3') primers previously developed to specifically target sulfate-reducers (Wagner *et al.*, 1998). The PCR conditions were as follows : denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 54°C for 30 s, and extension at 72°C for 2'15 min, for 30 cycles. PCR products were purified on a 1% agarose gel using the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and cloned using the TOPO

XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocols. The RNA-derived 16S rRNA, *mcrA* and *dsrB* gene sequences were determined on a ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') universal primer.

Phylogenetic and statistical analyses.

Sequences were analyzed using the NCBI BLAST search program within GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul *et al.*, 1990). The presence of chimeric sequences in the clone libraries was determined with the CHIMERA CHECK program of the Ribosomal Database Project II (Center for Microbial Ecology, Michigan State University, <http://wdcm.nig.ac.jp/RDP/html/analyses.html>). Potential chimeras were eliminated before phylogenetic trees were constructed. The cDNA sequences were then edited in the BioEdit v7.0.5 program (Hall, 1999) and aligned using the SINA webaligner (<http://www.arb-silva.de/>). The *mcrA* and *dsrB* sequences were translated into amino acid sequences using BioEdit and amino acid sequences were aligned using ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). Sequence data were analysed with the MEGA4.0.2 program (Tamura *et al.*, 2007). The phylogenetic trees were calculated by the neighbour-joining analysis. The robustness of inferred topology was tested by bootstrap resampling (1000). Sequence groups, using a 97% sequence similarity, were generated with the BlastClust program of the BLAST package (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>).

Rarefaction curves were calculated for the RNA-derived 16S rRNA, *mcrA* and *dsrB* gene libraries using the RarFac program (<http://www.icbm.de/pmbio/>), and a 95% similarity. The homologous coverage of the gene libraries were calculated using the following formula: $C=[1-(n_1/N)]*100$, where n_1 is the number of unique OTUs containing one 16S cDNA, *mcrA* or *dsrB* clone, and N is the number of clones analyzed for respective genes (Singleton *et al.*, 2001).

Nucleotide sequence accession numbers.

The sequence data reported here will appear in GenBank nucleotide sequence databases under the accession no. XXX to XXX for DNA-derived 16S rRNA DGGE band sequences and XXX to XXX for enrichment culture-derived 16S rRNA gene sequences, XXX to XXX for *mcrA*, XXX to XXX for *dsrB*, and XXX to XXX for RNA-derived 16S rRNA

RESULTS

Biochemical characteristics.

In the G11 pockmark sediments, porewater concentration analysis of sulfate showed a decrease in concentrations from 24 mM at the water-sediment interface down to 7 mM at 10 cmbsf (Fig. 2), clearly indicating a sulfate-reduction zone. However, sulfate concentrations never reached complete depletion with depth. Thus, it seems likely that the sulfate to methane transition zone was not reached in the CT22 sediment push core. The chloride profile (Fig. 2) displayed a regular increase with depth, ranging from 497 mM to 527 mM at 10 cmbsf, untypical for diffusing fluid flow regimes, hinting a possible moderate brine influence from deeper sources. Concentration of methane measured in the water column a few cms above the sampled sediment, was below $0.45 \mu\text{M}$ (J-C Caprais, pers comm).

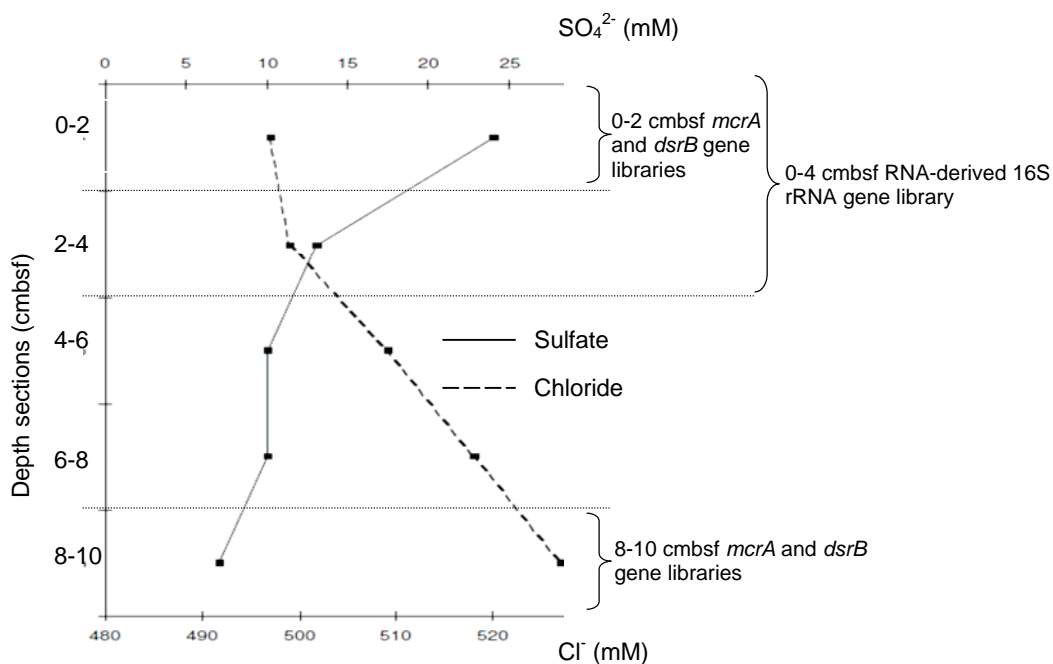


Figure 2: Sulfate and chloride porewater concentrations with depth in push core CT22 of the G11 Nyegga pockmark sediment.

Archaeal community structure based on the PCR-DGGE gel analysis.

Archaeal 16S rRNA gene PCR products were obtained from all sediment depths by nested PCR. The DGGE pattern (Fig. 3) suggested that archaeal diversity was relatively high at this site with 81 discernable bands from 0 to 10 cmbsf. Sequencing of excised DGGE bands confirmed that a majority of sequences were related to environmental clones retrieved from sediments or subseafloor sediments mainly associated to methane seeps (Table 1). These included sequences related to the ANME of the *Methanosarcinales* presumably involved in the anaerobic oxidation of methane, and these ANME sequences appear to be the dominant phylotype throughout the entire core. For example, band sequences Nye-dggeB4, and B13 to B15 could be related to the presumed methanotrophic ANME-1 group, with low sequence similarity percentages (72 to 87 %). Band sequences Nye-dggeB1, B2, B7, B8, B11, and B12 could be related to the presumed methanotrophic ANME-2 clade, with 74 to 98 % sequence similarities. Band sequences Nye-dggeB6, B9, and B10 could be related to methanogenic *Archaea*, with 76 to 80 % sequence similarities. In addition, one band sequence Nye-dggeB5 was related to the MBG-D with 83 % sequence similarity, and Nye-dggeB3 to the MG-I with 88 % sequence similarity.

Functional diversity of *mcrA* and *dsrB* genes.

mcrA gene libraries were constructed from surface sulfate-rich sediments and deeper sulfate-depleted sediments (0 to 2, and 8 to 10 cmbsf). From the 0-2 cmbsf section, a total of 31 *mcrA* clones were sequenced, and from the 8-10 cmbsf section, 30 *mcrA* clones were sequenced. Calculation of the coverage values displayed 100 % for the 0-2 cmbsf section clone library, and 90.3 % for the 8-10 cmbsf clone libraries. Furthermore, rarefaction curves (Supplementary material. SM1) were curvilinear showing that sufficient clones were analysed to cover the major part of the *mcrA* diversity. The gene libraries were constituted solely by sequences related to ANME clades. Similarly, DNA-derived 16S rRNA gene sequences related to ANME clades were present in the DGGE profile by using different targeted genes. A phylogenetic tree based on the *mcrA* genes (Fig. 4) showed a limited diversity and a majority of sequences most closely related to environmental clones rather than culture isolated representatives (Supplementary material. SM2).

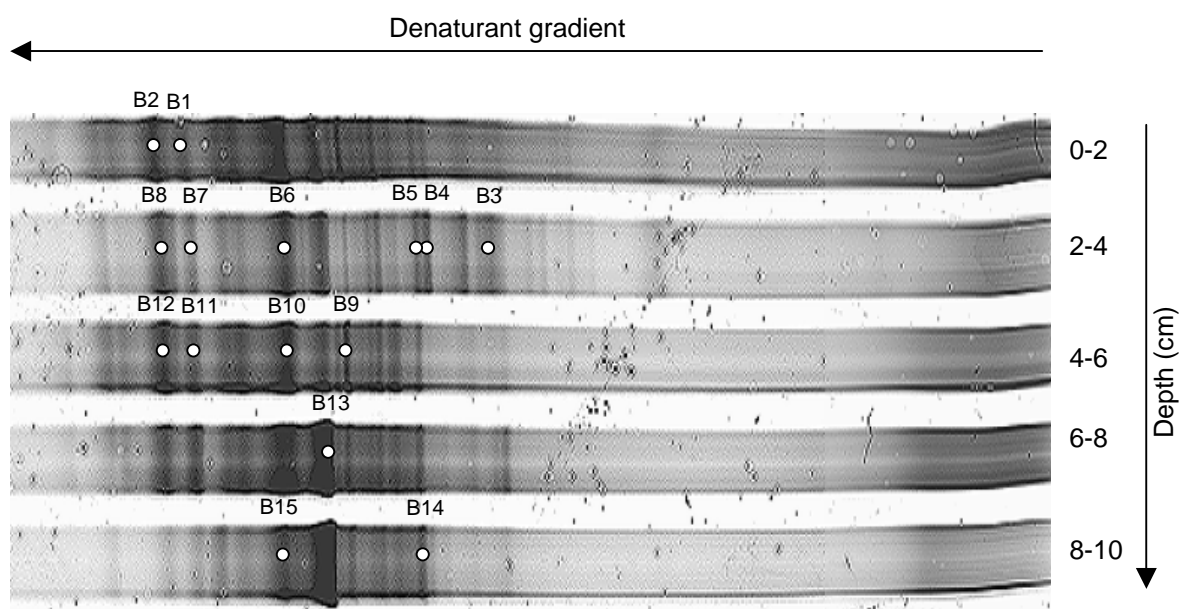


Figure 3: DGGE profile of archaeal 16S rRNA PCR fragments from DNA extracted from the G11 Nyegga pockmark sediments. White dots show representative bands that were excised and sequenced. Numbers B1 to B15 are bands named Nye-dggeB1 to Nye-dggeB15. Depth in cmbsf was labelled at the right of individual lanes.

Phylogenetic affiliation	DGGE band	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)
<i>Crenarchaeota</i> MG-I	Nye-dggeB3 (2-4 cmbsf)	SAGMA-8 (AB050238) South African Gold Mine	88
<i>Euryarchaeota</i> MBG-D	Nye-dggeB5 (2-4 cmbsf)	EJ1-50 (EF591427) East Sea of Korea sediments	83
ANME-1	Nye-dggeB4 (2-4 cmbsf)	A163E07 (FJ455958) Sulfate-Methane Transition, Santa Barbara Basin	87
	Nye-dggeB13 (6-8 cmbsf)	Hyd24-Arch03 (AJ578110) Hydrate Ridge, and Black Sea mats	87
	Nye-dggeB14 (8-10 cmbsf)	BA1b1 (AF134382) Methane seep, Eel River Basin	72
	Nye-dggeB15 (8-10 cmbsf)	BA1b1 (AF134382) Methane seep, Eel River Basin	82
ANME-2	Nye-dggeB1 (0-2 cmbsf)	a149 (FM179915) Gullfaks and Tommeliten methane seeps, North Sea	98
	Nye-dggeB2 (0-2 cmbsf)	MOBQ4318577 (AM942146) Gassy Subsurface Sediments, Marennes-Oléron Bay	85
	Nye-dggeB7 (2-4 cmbsf)	MN13BT4-152 (AY593258) Carbonate crust, Mediterranean Sea	74
	Nye-dggeB8 (2-4 cmbsf)	MN13BT4-152 (AY593258) Carbonate crust, Mediterranean Sea	84
	Nye-dggeB11 (4-6 cmbsf)	MOBQ4318577 (AM942146) Gassy Subsurface Sediments, Marennes-Oléron Bay	94
	Nye-dggeB12 (4-6 cmbsf)	MOBQ4318577 (AM942146) Gassy Subsurface Sediments, Marennes-Oléron Bay	86
Methanogens	Nye-dggeB6 (2-4 cmbsf)	HrhA33 (AJ878953) Rice rhizosphere, Germany	78
	Nye-dggeB9 (4-6 cmbsf)	A0-061006-344Fa-b9 (EU814551) Thermophilic municipal biogas plant	80
	Nye-dggeB10 (4-6 cmbsf)	strain AK-4 (AY663809) Anoxic marine sediments, Skan Bay, Alaska	76

Table 1: Identity of dominant archaeal DGGE bands detected by nested PCR in the G11 Nyegga pockmark sediments.

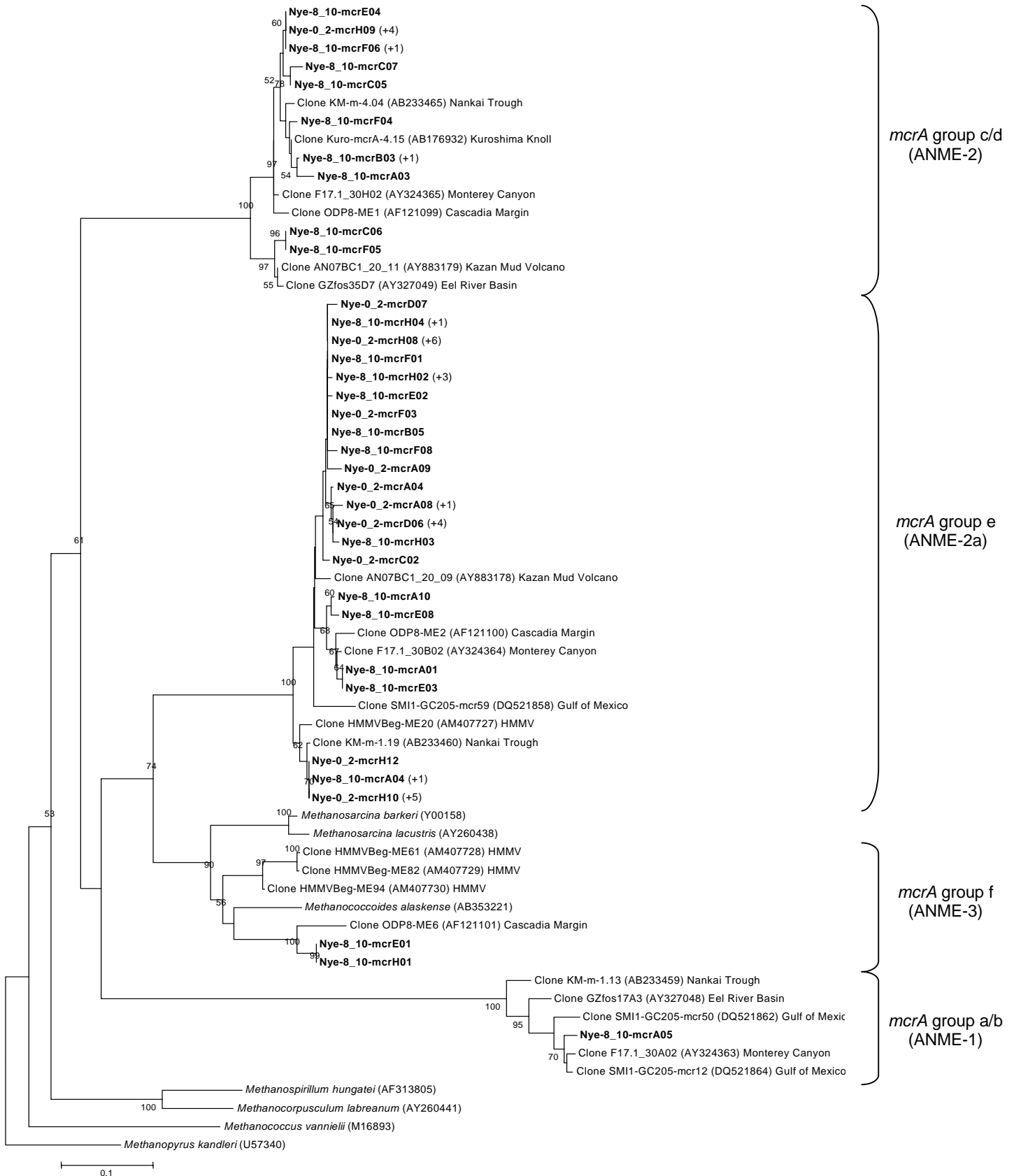


Figure 4: Phylogenetic tree based on translated partial amino acid sequences of the *mcrA* genes. Sequences were retrieved from the Nyegga G11 pockmark sediments. The tree topology was constructed using the neighbour-joining analysis. The numbers above the nodes indicate bootstrap values obtained for 1000 trials (values below 50% are not shown).

In the 0 to 2 cmbsf section, the major *mcrA* group, was group e (ANME-2a), followed by *mcrA* group c/d (ANME-2c) as defined by Hallam *et al.* (2003). In the 8-10 cmbsf section, group e dominated, followed by the group c/d, the group f (ANME-3, as defined by Lösekann *et al.* (Lösekann *et al.*, 2007)), and the group a/b (ANME-1).

In order to assess whether the SRB diversity changed with depth from sulfate-rich to sulfate-depleted sediment layers, *dsrB* gene libraries were performed from 0 to 2 cmbsf sediment sections, and 8 to 10 cmbsf of the CT22 push core. A total of 38 and 26 *dsrB* clones were sequenced from the 0-2 cmbsf and 8-10 cmbsf depths respectively. Calculation of the coverage values displayed 40 % for the 0-2 cmbsf gene library, and 80.8 % for the 8-10 cmbsf gene library. Furthermore, rarefaction curves (Supplementary material. SM1) were curvilinear showing that sufficient clones were analysed to cover the major part of the *dsrB* diversity. The surface sulfate-rich sediment layers (0 to 2 cmbsf) displayed a high SRB diversity (Fig. 5), and contained sequences affiliated to the *Desulfobacteraceae* which dominated the clone library. Other sequences were affiliated with the *Desulfobacterium anilini*-related group, the uncultured Group IV as defined by Dhillon *et al.* (2003), the *Syntrophobacteracea*, the *Desulfobulbaceae*, and the non-*Deltaproteobacteria* *Firmicutes* (Supplementary material. SM3). The deeper sulfate-depleted sediment layers (8 to 10 cmbsf) displayed a much lower diversity than the surface sediments, including three different clades (Fig. 5). Indeed, a majority of the clones were affiliated with the *Desulfovibrionaceae*, and a minority with the *Desulfobacterium anilini*-related group, the *Desulfobacteraceae*, and the uncultured Group IV (Supplementary material. SM3).

Identification of the metabolically active archaeal communities.

RNA was extracted from two different sediment depth (0 to 2 and 2 to 4 cmbsf of the G11 Nyegga pockmark. RNA were not of sufficient quality and quantity (36.4 and 5.5 ng.µL⁻¹ respectively) to be reverse transcribed, hence we pooled RNA extracted from both sections for retrotranscription. A total of 46 archaeal cDNA sequences from sediment depths 0 to 4 cmbsf were sequenced. Calculation of the coverage values displayed 97.8 %, and the rarefaction curve (Supplementary material. SM1) was curvilinear showing that sufficient clones were analysed to cover the major part of the diversity.

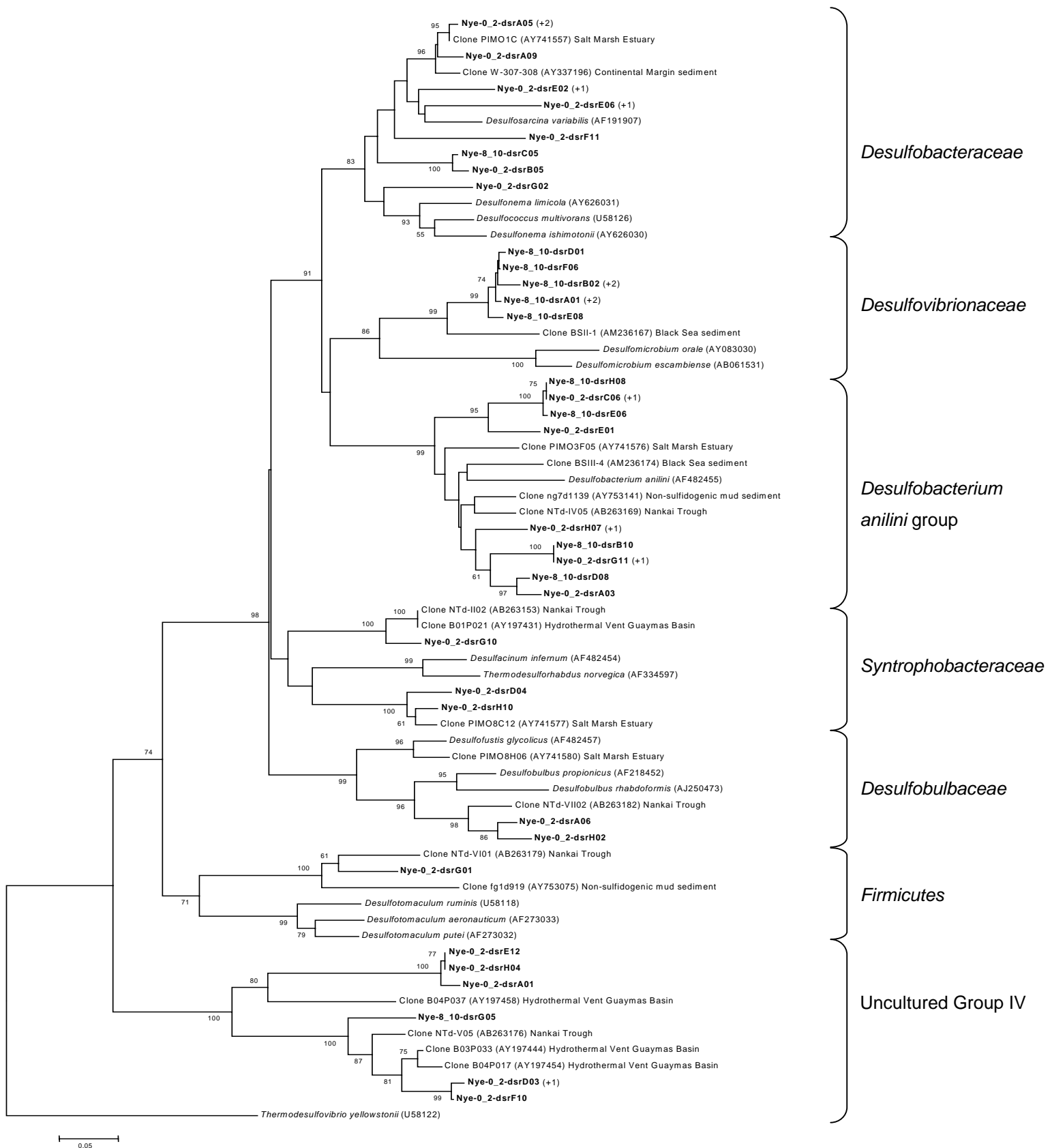


Figure 5: Phylogenetic tree based on translated partial amino acid sequences of the *dsrB* genes. Sequences were retrieved from the Nyegga G11 pockmark sediments. The tree topology was constructed using the neighbour-joining analysis. The numbers above the nodes indicate bootstrap values obtained for 1000 trials (values below 50% are not shown).

All analyzed sequences were related to clones retrieved from similar marine environments (Hydrate Ridge, Santa Barbara Basin, Milano Mud Volcano, and North Sea, Supplementary material. SM4). The metabolically active fraction of the archaeal communities (Fig. 6) was related to the presumed methanotrophic ANME-2 clade, with sequences affiliated with the ANME-2a/b (43.5 %), and with the ANME-2c (56.5 %).

Culturable methanogenic diversity.

Surprisingly methane production was detected in media designed to enrich hydrogenotrophic methanogens (H_2/CO_2) in the shallow sulfate-rich 0 to 2 cmbsf sediment section. Microscopic observations of positive enrichments from the H_2 medium suggest that methanogens were regular cocci. Under UV light, autofluorescent methanogens were detected as free cells. Total DNA was extracted from the H_2 enriched medium of the 0-2 cmbsf section. Phylogenetic affiliation of clones Nye-0_20-enr40 showed 99 % sequence similarity with cultured methanogen *Methanogenium marinum* (NR_028225, (Chong *et al.*, 2002).

DISCUSSION

Biochemical and biological characteristics.

Intriguingly, the chloride profile showed a linear increase of the porewater concentrations with sediment depth, and may not be due to simple diffusion of chloride from the water column into the sediment porewater. We assume that the Nyegga pockmark sediments could be moderately salt-impacted, even though chloride concentrations keep close to chloride seawater concentrations. Salt diapirs have been found in other areas of the North Sea, such as the Tommeliten methane seep (Niemann *et al.*, 2005).

The sulfate porewater profile showed a clear decrease from 0 to 10 cmbsf sediment depth (24 mM to 7 mM), but is not completely depleted at 10 cmbsf. Moreover sulfate-reducing bacteria were detected in this study. Thus sulfate-reduction may occur within these sediments layers. Furthermore, sulfate concentrations do not reach depletion, implying that the sulfate to methane transition zone was localised deeper than 10 cmbsf (Kaneko *et al.*, 2007).

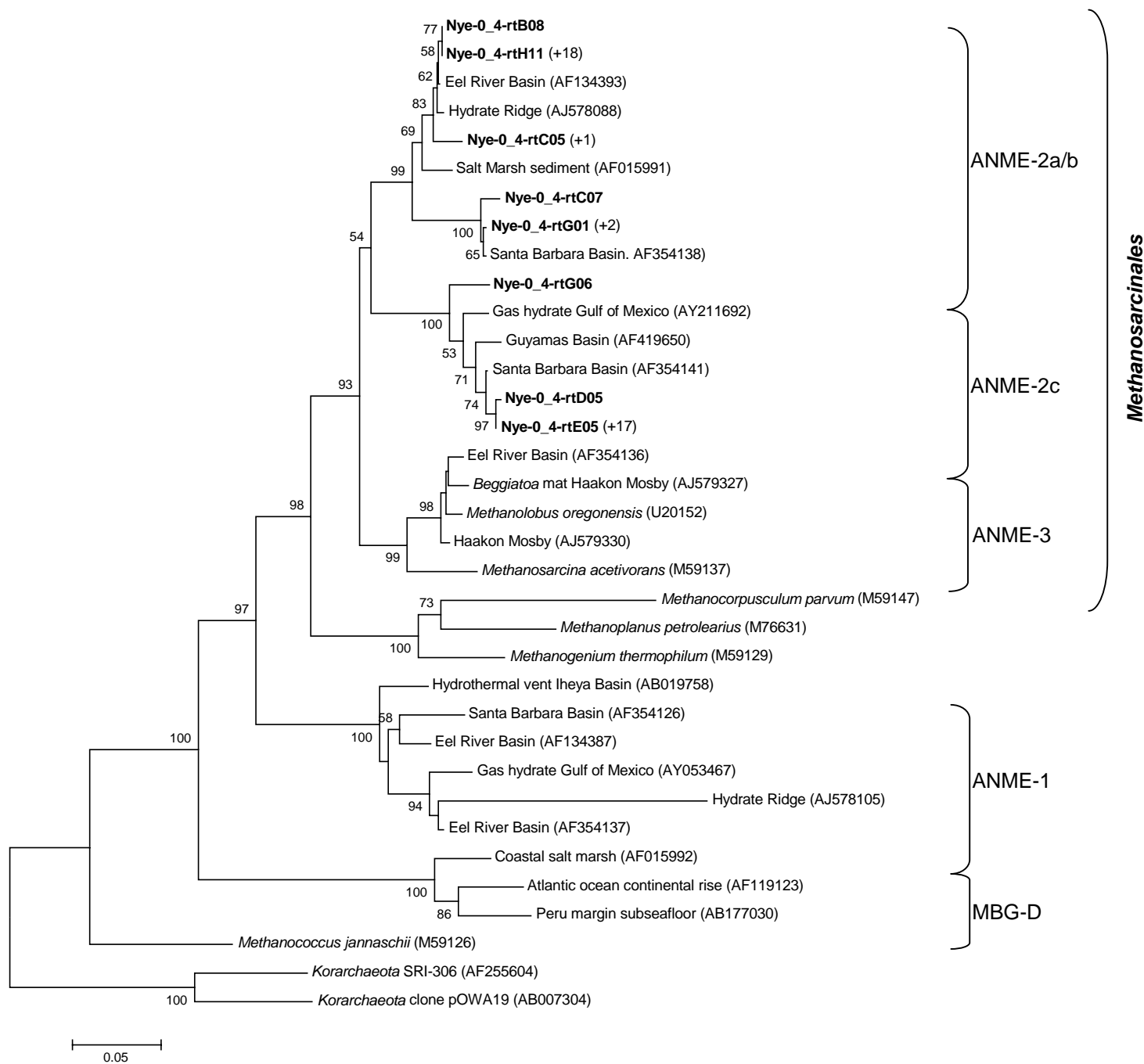


Figure 6: Phylogenetic tree based on RNA-derived archaeal 16S rRNA gene sequences. Sequences were retrieved from the Nyegga G11 pockmark sediments. The tree topology was constructed using the neighbour-joining analysis. The numbers above the nodes indicate bootstrap values obtained for 1000 trials (values below 50% are not shown).

Collected core CT22 sediments were colonized by brown-pigmented microbial mats. The sediment sample was collected beneath a bacterial mat. These mats are usually composed of filamentous sulfur-oxidizing bacteria (Mills *et al.*, 2004; Heijs *et al.*, 2005; Arakawa *et al.*, 2006). Methane-rich sediments underlying microbial mats are known to harbour dominant presumed anaerobic methane-oxidizing Archaea coupled to sulfate-reducing bacterial partners. Sulfide produced as a by-product of AOM often supports seabed microbial communities which derive energy from sulfide oxidation (Lösekann *et al.*, 2007). Filamentous sulfur-oxidizing bacteria then replenish the sulfate pool on the underlying sediments, which in turn stimulate the rates of AOM coupled to sulfate-reduction (Niemann *et al.*, 2006a). Thus bacterial mats are visible indicators of methane seepage on the seafloor where anaerobic methane oxidation coupled to sulfate reduction occur (Omoregie *et al.*, 2008). Moreover, sediments underlying bacterial mats seem to constitute suitable niches for AOM. Sediments populated by filamentous bacterial mats of *Beggiatoa* overlying methane-rich sediments in the Gulf Mexico were dominated by highly active ANME (Mills *et al.*, 2004). Microbial mats could trap methane in the underlying sediments, locally increasing methane concentrations and preventing methane sink (Lanoil *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2005). In the G11 Nyegga pockmark sediments, low methane concentrations were measured in the water column a few centimeters above the bacterial mat. Diverse ANME clades were detected and appear to be metabolically active in the 0 to 4 cmbsf sediment depths. As high sulfate concentrations and speculated high methane concentrations in porewater sediments were measured, the G11 Nyegga pockmark sediments could constitute a favourable ecological niche for active anaerobic oxidation of methane process.

Diversity of anaerobic methanotrophs.

At first sight, the fingerprint pattern obtained by DGGE analysis suggests a vertically structured community with low archaeal diversity mainly composed of anaerobic methanotrophs (ANME). ANME-1 were present in the entire core below 2 cmbsf, whereas the ANME-2 were detected down until 6 cmbsf and not below. In addition, metabolic genes indicative of methanogens/methanotrophs (*mcrA*) showed a heterogeneous community structure with a dominance of the ANME-2a (*mcrA* group e) and ANME-2c (*mcrA* group c/d) from the surface and deeper sediment layers. In addition, ANME-1 (*mcrA* group a/b) and ANME-3 (*mcrA* group f), absent

from the surface sediment layers, occurred in minor proportion in the deeper sediment layers. Furthermore the dominance of metabolically active ANME-2 (a, b, and c) was confirmed by the presence of RNA-derived 16S rRNA genes in sediment layers from the surface to 4 cmbsf. The infra-specific diversity within the ANME-2 might reflect physiological differences among the subgroups (Teske *et al.*, 2002).

Even if ANME-2 sequences dominated the gene libraries, ANME-1 and ANME-2 co-occurred in the G11 Nyegga pockmark sediments, as well as in other methane-rich habitats. The environmental conditions at Nyegga probably determined specific niches for establishment of ANME-1 and ANME-2 communities. It is assumed that AOM is influenced by environmental factors such as methane and sulfate fluxes from subsurface reservoirs (Nauhaus *et al.*, 2005). The ANME-2a and 2c subgroups were mostly retrieved from environments with moderate advective fluid flows such as gas hydrate mounds and *Beggiatoa* covered sediments in the Gulf of Mexico, or *Bathymodiolus* and *Calyptogena* populated sediments in the Kuroshima Knoll and the Sagami Bay (Mills *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2006). It has been suggested that ANME-1 could outgrow and outcompete ANME-2 for metabolites in so-called "high regimes" simulating in situ conditions (Girguis *et al.*, 2005). Fluids regimes in the G11 Nyegga pockmark sediments could be considered low because of the presence of tubeworms close to the sampled sediments as suggested for sediments of the Haakon Mosby mud volcano (Niemann *et al.*, 2006b), hence possibly explaining the dominance of ANME-2 sequences in the G11 Nyegga pockmark sediments. Distribution of anaerobic methanotrophic communities might also be governed by variation in other environmental parameters such as temperature, oxygen or salinity. The significant dominance of ANME-2 communities was not directly studied against specific environmental parameters. However cold temperatures measured in the G11 Nyegga pockmark sediments (around 4°C) is in good agreement with previous data. Indeed, it has been inferred that ANME-2 may be more adapted to cold temperatures compared to ANME-1 communities (Nauhaus *et al.*, 2005). Moreover, ANME-1 communities were documented to be more sensitive to oxygen than ANME-2 (Knittel *et al.*, 2005). In contrast with deeper anoxic sediments of the G11 Nyegga pockmark, surface sediment layers were occasionally perturbed by oxygen diffusion from the bottom water column. Finally, even if we did not provide direct evidence for specific influence of salinity on ANME communities, the linear increase in chloride concentrations suggested a brine influence which in

turn could regulate establishment of some ANME communities, such as ANME-1b as previously reported (Lloyd *et al.*, 2006).

It has been proposed that sediments underlying bacterial mats accumulate methane making them high methane concentrated sediments (Lanoil *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2005). Thus, sediments covered by microbial mats could be hot spots for AOM processes (Mills *et al.*, 2004). This could explain why we detected metabolically active ANME in sediment layers that do not belong to the sulfate to methane transition zone.

Diversity of sulfate-reducers.

Analysis of metabolic genes indicative of sulfate-reducers (*dsrB*) reflected a decreasing diversity with depth through chemical zones. A correlation between phylogenetic affiliation of the dominant SRB and specific environmental parameters can be assumed. Indeed, sulfate porewater concentrations rapidly decreased to values of 7mM, and probably had a major influence on the SRB community structure. Thus, the decrease in SRB diversity with depth could be due to the decrease in porewater sulfate concentrations, and in organic substrates availability as well (Leloup *et al.*, 2007). In the surface sediments underlying microbial mats in the G11 Nyegga pockmark, variation in potential organic substrates concentrations for SRB such as fatty acids, or amino acids, might have affected the SRB community structure (Rooney-Varga *et al.*, 1997). In contrast, strong increasing chloride concentrations with depth could have influenced for instance the presence of *Desulfosarcina*-related SRB in deeper sediment layers of the G11 Nyegga pockmark (Miletto *et al.*, 2008).

The sulfate-rich zone was dominated by sequences related to the *Desulfobacteraceae* and *Desulfobacterium anilini* members, both considered complete-oxidizing SRB (Rooney-Varga *et al.*, 1997; Bahr *et al.*, 2005), whereas very few sequences of incomplete-oxidizing SRB were found, such as members of the *Desulfobulbaceae*. Cultured members of the *D. anilini* group couple dissimilatory reduction of sulfate to the degradation of various aromatic hydrocarbons (Leloup *et al.*, 2007). These SRB have been found in sulfate-rich sediments (Kaneko *et al.*, 2007), but mostly in SMTZ where AOM rates were the highest (Lloyd *et al.*, 2006). Three minor SRB clusters also found in the surface sediment layers were affiliated to the *Syntrophobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, and the *Desulfomaculum*. These are

nutritionally versatile SRB, using acetate, lactate, alcohols, pyruvate, and fatty acids as energy sources, or heavy metals (Chang *et al.*, 2001; Dhillon *et al.*, 2003; Bahr *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2008). Hence members of these clusters would have a competitive advantage in environments where a broad range of organic substrates are available (Liu *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2008).

dsrB sequences affiliated with the SRB uncultured Group IV were found in both surface sulfate-rich and deeper sediment layers. Group IV sequences were previously retrieved in the Guaymas Basin, in sediments devoid of visible microbial mats, and characterized by liquid petroleum mud (Dhillon *et al.*, 2003). The Group IV sequences were phylogenetically distinct from *dsrAB* genes found in the AOM zone, suggesting that they were not ANME bacterial partners. Group VI sequences were also detected in sediments with rich complex organic compounds in salt marshes (Bahr *et al.*, 2005), and in salt-impacted sediments (Leloup *et al.*, 2006).

Relation between SRB and ANME in the G11 Nyegga pockmark sediment.

ANME *Archaea* can occur as single cells or as monospecific aggregations (Knittel and Boetius, 2009). Archaeal RNA-derived 16S rRNA, *mcrA* and bacterial *dsrB* gene libraries were dominated by sequences previously associated with AOM. Indeed, in the sulfate-rich sediment layers, the ANME-2 dominated archaeal gene libraries, and SRB community was mainly represented by sequences belonging to organisms of the *Desulfosarcina* and *Desulfococcus*. Hence molecular evidence suggests the occurrence of a possible syntrophic association between the ANME-2 and the SRB. Because of the affiliation of the ANME-2 with the nutritional versatile *Methanosarcinales* methanogenic order, Orphan *et al.* (2001) suggested that ANME-2 could oxidize methane to acetate and hydrogen (instead of CO₂ and H₂ as is usually proposed), compounds consumable by the *Desulfosarcinales*. However there exists no phylogenetic difference between the *dsrB* sequences of free living SRB and sequences of the syntrophic SRB (Lloyd *et al.*, 2006). Further analysis, such as FISH would be necessary to ascertain this hypothesis.

ANME-3 were detected in deep sediments of the G11 Nyegga pockmark, but sulfate-reducers were not affiliated to the *Desulfobulbus*. This is not very surprising because many of the ANME-3 communities found in *Beggiatoa* mats associated sediments of the HMMV occurred as single cells, and others were loosely associated with the *Desulfobulbus* (Lösekann *et al.*, 2007). Previous reports showed that high abundance

of single ANME-3 cells were found in brine-impacted sediments of the Chefren mud volcano (Omoregie *et al.*, 2008). Thus ANME-3 could be active with syntrophic partners other than SRB (Lösekann *et al.*, 2007), such as denitrifying bacteria (Raghoebarsing *et al.*, 2006), iron- and manganese-oxidizing bacteria (Beal *et al.*, 2009). In contrast, clones affiliated with the *Desulfobulbaceae* were detected in the shallow sediment layers without evidence of the presence of ANME-3 members. This points out that the SRB (apart from the *Desulfosarcina* branch) can grow independently of AOM (Lloyd *et al.*, 2006). This has been observed in Gulf of Mexico seep sediments, where it was explained to be caused by the availability and thus oxidation of other labile hydrocarbons (alkanes, complex aliphatic and aromatic compounds, and oil) in addition to methane (Joye *et al.*, 2004; Orcutt *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2006).

Methanogens were retrieved from the surface sediment layers of the G11 Nyegga pockmark. Three DGGE bands from 2 to 6 cmbsf were distantly affiliated with the methanogenic order *Methanosarcinales*. Enrichment cultures were obtained from the surface sediments. Molecular identification suggested the presence of culturable *M. marinum* of the *Methanomicrobiales*. *M. marinum* is able to use H₂/CO₂ as catabolic substrates, but is also able to grow by reducing CO₂ with formate (Chong *et al.*, 2002). Growth with formate is slower than with H₂, however formate could be an alternative electron donor in these sulfate-rich sediment layers containing SRB that outcompete hydrogenotrophic methanogens for H₂. The absence of molecular signatures of methanogens in the gene libraries suggests that methanogenic populations represented a small fraction of the archaeal community (Kendall *et al.*, 2007). Also, the specific primers used to amplify *mcrA* genes do not seem to successfully amplify the *Methanobacteriales* or *Methanosaetaceae mrtA* genes (Banning *et al.*, 2005). ANME communities were present and metabolically active in the surface sediments, whereas culturable methanogens of the *Methanomicrobiales* were enriched from the same sediment layers. These results could point out that AOM and methanogenesis processes took place simultaneously in the sulfate-rich sediment layers of the G11 Nyegga pockmark, as was previously described in microbial mats of the Black Sea (Seifert *et al.*, 2006). Many authors have proposed that ANME were methanogens able to reverse their enzymatic processes (Treude *et al.*, 2007), or that ANME may mediate methanogenesis (Orcutt *et al.*, 2005). Thus,

we can assume that ANME and methanogenic communities co-occurred in the surface sediment layers.

In conclusion, the results of this study suggest that chemical zonation with depth determined by chloride and sulfate porewater concentrations influenced the ANME and SRB community diversity and structure in sediments of the G11 Nyegga pockmark. The *mcrA* and RNA-derived 16S rRNA gene libraries, as well as the DGGE band sequence analysis, were dominated by sequences related to the ANME. Therefore AOM could be the dominant process in these sediments. Furthermore the ANME communities occurring in the G11 Nyegga pockmark sediments are comparable to those found in other marine ecosystems. Here, methanogenesis, AOM and SR processes seem to be accomplished by a complex microbial ecosystem, intertwining the sulfur and methane cycles. Further studies on sediments associated with other pockmarks would help confirm that AOM processes are ubiquitous and certainly the most important control of methane sink in various geological structures at cold seeps.

Acknowledgements.

We would like to thank Hervé Nouzé the chief scientist of the VICKING cruise, the ROV team, the officers and crew of the RV *Pourquoi Pas?* as well as the shipboard scientific community for their help at sea. This work was funded by the HERMES project, and the ANR Deep Oasis.

REFERENCES

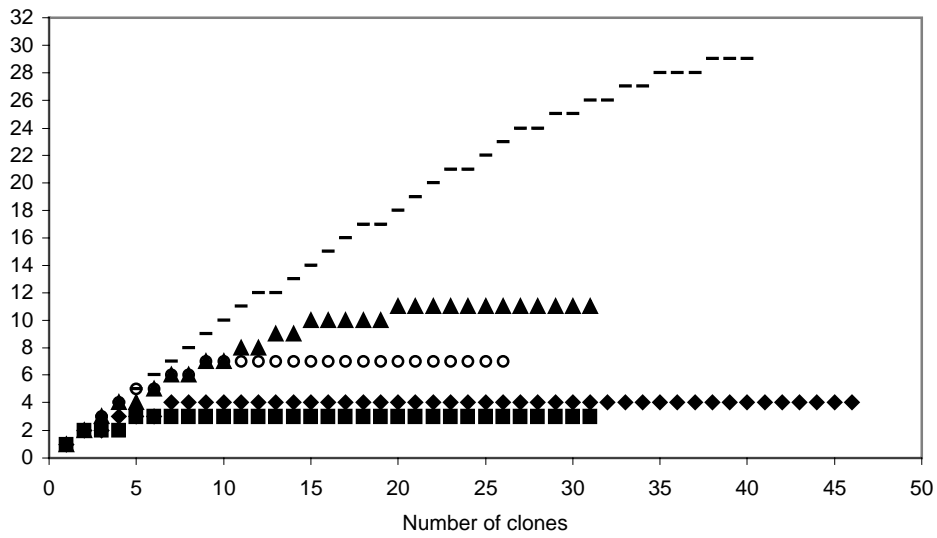
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Arakawa, S., Sato, T., Sato, R., Zhang, J., Gamo, T., Tsunogai, U. *et al.* (2006) Molecular phylogenetic and chemical analyses of the microbial mats in deep-sea cold seep sediments at the northeastern Japan Sea. *Extremophiles* **10**: 1937-1951.
- Bahr, M., Crump, B.C., Klepac-Ceraj, V., Teske, A., Sogin, M.L., and Hobbie, J.E. (2005) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. *Environ. Microbiol.* **7**: 1175–1185.
- Balch, W.E., and Wolfe, R.S. (1976) New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 781-791.
- Banning, N., Brock, F., Fry, J.C., Parkes, R.J., Hornibrook, E.R.C., and J, W.A. (2005) Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. *Environ. Microbiol.* **7**: 947 - 960.
- Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009) Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. *Science* **325**: 184-187.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., and Gieske, A. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Bouloubassi, I., Nabais, E., Pancost, R.d., Anne, L., and Marie-Hélène, T. (2009) First biomarker evidence for methane oxidation at cold seeps in the Southeast Atlantic (REGAB pockmark). *Deep-Sea ResearchII* **56**: 2239–2247.

- Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais, J.C. *et al.* (2009) Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. *Deep-Sea Research II* **56**: 2248–2258.
- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Baneras, L., Salio, C.P., and Muyzer, G. (2000) Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 499-508.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V.J. *et al.* (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**: 338-348.
- Chang, Y.-J., Peacock, A.D., Long, P.E., Stephen, J.R., McKinley, J.P., MacNaughton, S.J. *et al.* (2001) Diversity and Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in Groundwater at a Uranium Mill Tailings Site. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3149–3160.
- Chong, S.C., Liu, Y., Cummins, M., Valentine, D.L., and R, B.D. (2002) Methanogenium marinum sp. nov., a H₂-using methanigen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 263-270.
- Cook, K.L., Whitehead, T.R., Spence, C., and Cotta, M.A. (2008) Evaluation of the sulfate-reducing bacterial population associated with stored swine slurry. *Anaerobe* **14**: 172– 180.
- 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.
- Dimitrov, L., and Woodside, J. (2003) Deep sea pockmark environments in the eastern Mediterranean. *Mar. Geol.* **195**: 263-276.
- Fang, J., Shizuka, A., Kato, C., and Schouten, S. (2006) Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene and lipid analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**: 429-441.
- Foucher, J.-P., Westbrook, G.K., Boetius, A., Ceramicola, S., Dupré, S., Mascle, J. *et al.* (2009) Structure and drivers of cold seep ecosystems. *Oceanography* **22**: 92-109.
- Girguis, P.R., E, C.A., and DeLong, E.F. (2005) Growth and Population Dynamics of Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous-Flow Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3725-3733.
- Hales, B.A., C, E., Titchie, D.A., Hall, G., W, P.R., and R, S.J. (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 668-675.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95–98.
- Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5483-5491.
- Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**: 1457-1462.
- Heijs, S.K., Sinninghe Damsté, J.S., and Forney, L.J. (2005) Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 47-56.
- Hovland, M., Svensen, H., Forsberg, C.F., Johansen, H., Fichler, C., Fossa, J.H. *et al.* (2005) Complex pockmarks with carbonate-ridges off mid-Norway: products of sediment degassing. *Mar. Geol.* **218**: 191-206.
- Hovland, M., and Svensen, H. (2006) Submarine pingoes: indicators of shallow gas hydrates in a pockmark at Nyegga, Norwegian sea. *Mar. Geol.* **228**: 15-23.
- Hustoft, S., Bünz, S., Mienert, J., and Chand, S. (2009) Gas hydrate reservoir and active methane-venting province in sediments on <20 Ma young oceanic crust in the Fram Strait, offshore NW-Svalbard. *Earth Planet. Sci. Lett.* **284**: 12– 24.
- Inagaki, F., Tsunogai, U., Suzuki, M., Kosaka, A., Machiyama, H., Takai, K. *et al.* (2004) Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing pmoA, mmoX, mxaF, mcrA, and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7445-7455.
- Joulian, C., Ramsing, N.B., and Ingvorsen, K. (2001) Congruent Phylogenies of Most Common Small-Subunit rRNA and Dissimilatory Sulfite Reductase Gene Sequences Retrieved from Estuarine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 3314–3318.
- Joye, S.B., Boetius, A., Orcutt, B.N., Montoya, J.P., Schulz, H.N., Erickson, M.J., and Lugo, S.K. (2004) The anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction in sediments from Gulf of Mexico cold seeps. *Chem. Geol.* **205**: 219-238.

- Kaneko, R., Hayashi, T., Tanahashi, M., and Naganuma, T. (2007) Phylogenetic Diversity and Distribution of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes from Deep-Sea Sediment Cores. *Marine Biotechnology* **9**: 429–436.
- Kendall, M.M., Wardlaw, G.D., Tang, C.F., Bonin, A.S., Liu, Y., and Valentine, D.L. (2007) Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 407-414.
- Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic Archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 467-479.
- Knittel, K., and Boetius, A. (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 311–334.
- Krüger, M., Meyerdierks, A., Glöckner, F.O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M. *et al.* (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**: 878-881.
- Lanoil, B.D., La Duc, M.T., Wright, M., Kastner, M., Neelson, K.H., and Bartlett, D. (2005) Archaeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 167-177.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H. *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.
- Leloup, J., Quillet, L., Berthe, T., and Petit, F. (2006) Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 230–238.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jorgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ. Microbiol.* **9**: 131-142.
- Liu, X., Bagwell, C.E., Wu, L., Devol, A.H., and Zhou, J. (2003) Molecular Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria from Two Different Continental Margin Habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** 6073–6081.
- Lloyd, K.G., Lapham, L., and Teske, A. (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b Archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7218-7230.
- Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3348-3362.
- Mazzini, A., Svensen, H., Hovland, M., and Planke, S. (2006) Comparison and implications from strikingly different authigenic carbonates in a Nyegga complex pockmark, G11, Norwegian Sea. *Mar. Geol.* **231**: 89-102.
- Miletto, M., Loy, A., Antheunisse, A.M., Loeb, R., Bodelier, P.L.E., and Laanbroek, H.J. (2008) Biogeography of sulfate-reducing prokaryotes in river floodplains. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**: 395–406.
- Mills, H.J., Hodges, C., Wilson, K., MacDonald, I.R., and Sobecky, P.A. (2003) Microbial diversity in sediments associated with surface-breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 39-52.
- Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., and Sobecky, P.A. (2004) Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with *Beggiatoa* species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5447-5458.
- Nauhaus, K., Treude, T., Boetius, A., and Krüger, M. (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environ. Microbiol.* **7**: 98-106.
- Niemann, H., Elvert, M., Hovland, M., Orcutt, B., Judd, A., Suck, I. *et al.* (2005) Methane emission and consumption at a North Sea gas seep (Tommeliten area). *Biogeosciences* **2**: 335-351.
- Niemann, H., Duarte, J., Hensen, C., Omoregie, E., Magalhaes, V.H., Elvert, M. *et al.* (2006a) Microbial methane turnover at mud volcanoes of the Gulf of Cadiz. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**: 5336-5355.
- Niemann, H., Lösekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K. *et al.* (2006b) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**: 854-858.
- Omoregie, E.O., Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Røy, H. *et al.* (2008) Biogeochemistry and Community Composition of Iron- and Sulfur-Precipitating Microbial Mats at the Chefren Mud Volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3198-3215.
- Omoregie, E.O., Niemann, H., Mastalerz, V., de Lange, G.J., Stadnitskaia, A., Mascle, J. *et al.* (2009) Microbial methane oxidation and sulfate reduction at cold seeps of the deep Eastern Mediterranean Sea. *Mar. Geol.* **261**: 114–127.

- Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., and Joye, S.B. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**: 4267-4281.
- Orphan, V.J., Hinrichs, K.-U., Ussler III, W., Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P. *et al.* (2001) Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1922-1934.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F.L., and Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3367-3373.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F.W., Rijpstra, I.C. *et al.* (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**: 918- 921.
- Rooney-Varga, J., Devereux, R., Evans, R.S., and Hines, M.E. (1997) Seasonal Changes in the Relative Abundance of Uncultivated Sulfate-Reducing Bacteria in a Salt Marsh Sediment and in the Rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3895–3901.
- Seifert, R., Nauhaus, K., Blumenberg, M., Krüger, M., and Michaelis, W. (2006) Methane dynamics in a microbial community of the Black Sea traced by stable carbon isotopes in vitro. *Organic geochemistry* **37**: 1411-1419.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L., and Whitman, W.B. (2001) Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4374–4376.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: :1596–1599.
- Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., 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.
- Thauer, R.K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Toffin, L., Webster, G., Weightman, A.J., Fry, J.C., and Prieur, D. (2004) Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 357–367.
- Treude, T., Orphan, V., Knittel, K., Gieseke, A., House, C.H., and Boetius, A. (2007) Consumption of methane and CO₂ by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2271-2283.
- Vetriani, C., Jannasch, H.W., J, M.B., Stahl, D.A., and Reysenbach, A.-L. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4375-4384.
- Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., and Stahl, D.A. (1998) Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *J. Bacteriol.* **180**: 2975–2982.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 316-322.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



SM1: Rarefaction analysis of the *mcrA*, *dsrB*, and RNA-derived 16S rRNA gene libraries, done using the RarFac program. ■ *mcrA* section 0-2 cbsf, ▲ *mcrA* section 8-10 cbsf, - *dsrB* section 0-2 cbsf, ○ *dsrB* section 8-10 cbsf, and ◆ RNA-derived 16S rRNA section 0-4 cbsf.

Phylogenetic affiliation	Clone	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)	
<i>mcrA</i> group a/b	Nye-8_10-mcrA05	T201_30C04 (AY324373) Marine sediments, Eel River	94	
<i>mcrA</i> group c/d	Nye-0_2-mcrH09	AN07BC1_20_05 (AY883176) Sediments in the Kazan mud volcano	98	
	Nye-8_10-mcrA03	AN07BC1_15_29 (AY883170) Sediments in the Kazan mud volcano	96	
	Nye-8_10-mcrB03	AN07BC1_15_29 (AY883170) Sediments in the Kazan mud volcano	96	
	Nye-8_10-mcrC05	AN07BC1_20_05 (AY883176) Sediments in the Kazan mud volcano	96	
	Nye-8_10-mcrC06	BR_42bB08 (AY324367) Marine sediments, Blake Ridge	95	
	Nye-8_10-mcrC07	AN07BC1_20_05 (AY883176) Sediments in the Kazan mud volcano	96	
	Nye-8_10-mcrE04	C4.1_30E06 (AY324362) Marine sediments, Blake Ridge	95	
	Nye-8_10-mcrF04	C4.1_30E06 (AY324362) Marine sediments, Blake Ridge	95	
	Nye-8_10-mcrF05	BR_42bB08 (AY324367) Marine sediments, Blake Ridge	95	
	Nye-8_10-mcrF06	AN07BC1_20_05 (AY883176) Sediments in the Kazan mud volcano	97	
<i>mcrA</i> group e	Nye-0_2-mcrA04	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97 %	
	Nye-0_2-mcrA08	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	96 %	
	Nye-0_2-mcrA09	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	96 %	
	Nye-0_2-mcrC02	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	96 %	
	Nye-0_2-mcrD06	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97 %	
	Nye-0_2-mcrD07	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	96 %	
	Nye-0_2-mcrF03	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	96 %	
	Nye-0_2-mcrH08	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97 %	
	Nye-0_2-mcrH10	KM-m-1.19 (AB233460) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	96 %	
	Nye-0_2-mcrH12	KM-m-1.19 (AB233460) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	96 %	
	Nye-8_10-mcrA01	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	95 %	
	Nye-8_10-mcrA04	KM-m-1.19 (AB233460) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	96 %	
	Nye-8_10-mcrA10	F17.1_30B02 (AY324364) Marine sediments, Monterey Canyon	97 %	
	Nye-8_10-mcrB05	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97 %	
	Nye-8_10-mcrE02	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	95 %	
	Nye-8_10-mcrE03	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	95 %	
	Nye-8_10-mcrE08	F17.1_30B02 (AY324364) Marine sediments, Monterey Canyon	96 %	
	Nye-8_10-mcrF01	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97 %	
	Nye-8_10-mcrF08	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	95 %	
	Nye-8_10-mcrH02	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97 %	
	Nye-8_10-mcrH03	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97 %	
	Nye-8_10-mcrH04	KM-m-4.10 (AB233466) Sediments from methane seeps of the Nankai Trough	97 %	
	<i>mcrA</i> group f	Nye-8_10-mcrE01	HMMVBeg-ME94 (AM407730) Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea	83 %
		Nye-8_10-mcrH01	HMMVBeg-ME94 (AM407730) Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea	83 %

SM2: Representative clones of the *mcrA* gene libraries (Nye-0_2 for the 0-2 cmbsf gene library, and Nye-8_10 for 8-10 cmbsf).

Phylogenetic affiliation	Clone	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)
<i>Desulfobacteraceae</i>	Nye-0_2-dsrA05	PIMO1C04 (AY741557) New England salt marsh, Plum Island Estuary sediment	97
	Nye-0_2-dsrA09	PIMO1C04 (AY741557) New England salt marsh, Plum Island Estuary sediment	85
	Nye-0_2-dsrB05	VHS095 (DQ112211) Polluted harbor sediments	80
	Nye-0_2-dsrE02	M-300-226 (AY337184) Continental margin sediment off the Pacific coast of Mexico	96
	Nye-0_2-dsrE06	NTd-I22 (AB263146) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough	90
	Nye-0_2-dsrF11	PIMO3C12 (AY741572) New England salt marsh, Plum Island Estuary sediment	80
	Nye-0_2-dsrG02	LGWG15 (EF065026) Leachate-polluted Aquifers (groundwater) in Laogang	82
	Nye-8_10-dsrC05	VHS095 (DQ112211) Polluted harbor sediments	80
<i>Desulfovibrionaceae</i>	Nye-8_10-dsrA01	BSII-1 (AM236167) Sulfate and methane zones, Black Sea	91
	Nye-8_10-dsrB02	BSII-1 (AM236167) Sulfate and methane zones, Black Sea	90
	Nye-8_10-dsrD01	BSII-1 (AM236167) Sulfate and methane zones, Black Sea	90
	Nye-8_10-dsrE08	BSII-1 (AM236167) Sulfate and methane zones, Black Sea	90
	Nye-8_10-dsrF06	BSII-1 (AM236167) Sulfate and methane zones, Black Sea	91
<i>D. anilini</i> group	Nye-0_2-dsrA03	PIMO3F05 (AY741576) New England salt marsh, Plum Island Estuary sediment	81
	Nye-0_2-dsrC06	SMI1-GC205-dsr95 (DQ521853) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments	92
	Nye-0_2-dsrE01	INOC-DSR13 (AF360652) Estuarine sediments, Kysing Fjord, Denmark	84
	Nye-0_2-dsrG11	NTd-IV05 (AB263169) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough	81
	Nye-0_2-dsrH07	ng7d1139 (AY753141) Nonsulfidogenic deltaic tropical mobile mud sediment	84
	Nye-8_10-dsrB10	NTd-IV05 (AB263169) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough	81
	Nye-8_10-dsrD08	BSI-3 (AM236156) Sulfate and methane zones, Black Sea	81
	Nye-8_10-dsrE06	SMI1-GC205-dsr95 (DQ521853) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments	95
	Nye-8_10-dsrH08	SMI1-GC205-dsr95 (DQ521853) Hypersaline Gulf of Mexico Sediments	92
	<i>Desulfobulbaceae</i>	Nye-0_2-dsrA06	NTd-VII02 (AB263182) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough
Nye-0_2-dsrH02		NTd-VII02 (AB263182) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough	83
<i>Syntrophobacteraceae</i>	Nye-0_2-dsrD04	PIMO8C12 (AY741577) New England salt marsh, Plum Island Estuary sediment	88
	Nye-0_2-dsrG10	NTd-II02 (AB263153) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough	95
	Nye-0_2-dsrH10	PIMO8C12 (AY741577) New England salt marsh, Plum Island Estuary sediment	88
<i>Firmicutes</i>	Nye-0_2-dsrG01	NTd-VI01 (AB263179) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough	86
	Nye-0_2-dsrA01	B04P037 (AY197458) Guaymas Basin hydrothermal vent sediments	78
Uncultured Group IV	Nye-0_2-dsrD03	NTd-V05 (AB263176) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough	92
	Nye-0_2-dsrE12	VHS104 (DQ112195) Polluted harbor sediments	77
	Nye-0_2-dsrF10	NTd-V05 (AB263176) Deep-sea sediment cores, Nankai Trough	93
	Nye-0_2-dsrH04	VHS104 (DQ112195) Polluted harbor sediments	77

SM3: Representative clones of the *dsrB* gene libraries (Nye-0_2 for the 0-2 cmbfsf gene library, and Nye-8_10 for 8-10 cmbfsf).

Phylogenetic affiliation	Clone	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)
ANME-2a/b	Nye-0_4-rtB08	Milano-WF2A-15 (AY592839)	99
	Nye-0_4-rtC05	Deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano Hyd24-Arch08 (AJ578103)	98
	Nye-0_4-rtC07	Cold seep gas hydrate, Hydrate Ridge SB-24a1C12 (AF354138)	98
	Nye-0_4-rtG01	Anoxic marine sediments, Eel River Basin and Santa Barbara Basin SB-24a1C12 (AF354138)	99
	Nye-0_4-rtH11	Anoxic marine sediments, Eel River Basin and Santa Barbara Basin Milano-WF2A-15 (AY592839)	99
ANME-2c	Nye-0_4-rtD05	Deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano Milano-WF2A-15 (AY592839)	99
	Nye-0_4-rtE05	Deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano Milano-WF2A-15 (AY592839)	100
	Nye-0_4-rtG06	Deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano Tomm05_1274_3_Arch40 (FM179816)	96
		Gulfaks and Tommeliten methane seeps, Northern North Sea	

SM4: Representative clones of the RNA-derived 16S rRNA 0 to 4 cmbsf sediment section gene library.

CHAPITRE 4

**Etude de la diversité des communautés *Archaea*
métaboliquement actives dans des sédiments
peuplés de vers tubicoles en Mer de Norvège**

Préambule

Dans les zones d'émissions de fluides froids, les vers de la famille des Siboglinidés sont responsables de la bioturbation des sédiments, qui entraîne une augmentation de la pénétration de l'oxygène dans les sédiments. De plus, les vers ont la capacité d'éliminer du méthane, du sulfate, des sulfures et de l'oxygène par diffusion passive à travers leurs tubes. L'activité biologique des vers modifie donc la disponibilité en accepteurs d'électrons (SO_4^{2-} , O_2), qui a sûrement un impact sur la répartition des communautés microbiennes dans les sédiments associés aux vers. Les communautés sédimentaires associées à des vers tubicoles ont été peu caractérisées, puisque les études se focalisent essentiellement sur les bactéries symbiotiques chez ces animaux.

Dans le but d'analyser la diversité de ces communautés sédimentaires, nous avons échantillonné des sédiments peuplés par des "patches" peu denses de vers tubicoles des Siboglinidés appartenant aux genres *Oligobrachia haakonmosbiensis* et *Sclerolinum contortum* dans la zone de glissement sous-marin Storegga, en Mer de Norvège. La présence des vers tubicoles indique *a priori* l'existence de flux de fluides peu intenses.

Pour accéder à la diversité des communautés *Archaea* dans des sédiments associés à des vers tubicoles, nous avons analysé la distribution de la fraction de la communauté *Archaea* métaboliquement active via la construction de banques de clones basées sur les gènes codant l'ARNr 16S dérivés d'extraits d'ARN.

**Metabolically active *Archaea* at Cold Seep sediments populated by
Siboglinidae tubeworms from the Storegga Slide**

(Accepted pending revisions in Microbial Ecology)

Cassandra Sara Lazar, Julie Dinasquet, Patricia Pignet, Daniel Prieur, and Laurent Toffin

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, Ifremer Centre de Brest, Département Etudes des Environnements Profonds, Université de Bretagne Occidentale, BP 70, 29280 Plouzané, France.

Correspondance: Laurent Toffin, Tel. : +33(0)2 98 22 43 96, Fax. +33(0) 98 22 47 57, e-mail: Laurent.toffin@ifremer.fr.

ABSTRACT

Siboglinid tubeworms in cold seep sediments can locally modify the geochemical distribution of electron acceptors and donors, hence creating ecological niches for the activity of prokaryotic populations. Therefore archaeal communities associated with shallow sediments populated by *Oligobrachia haakonmosbiensis* *Sclerolium contortum* in the Storegga Slide were examined in this study. Vertical distribution of archaeal communities was assessed by PCR-DGGE based on 16S rRNA genes. The fingerprinting profile showed a shift in the archaeal community structure probably due to tubeworm perturbation was proposed to be linked to a change from oxic to anoxic sediment layers. In addition, the dominant metabolically active *Archaea* sequences were affiliated to Rice Cluster V sequences which are not typically found in marine sediments. The Storegga Slide sediments also harboured a high diversity of other minor metabolically active groups affiliated with uncultivated lineages (TMEG, MBG-D, MBG-E, DHVE, LDS, VAL III, SM1). Thus, the specific geochemical sedimentary environment created by the tubeworms seems to support a great number of active archaeal populations in the *Siboglinidae* populated Storegga Slide sediments.

INTRODUCTION

The Storegga Slide (Fig. 1), off Norway, lies on an unstable passive continental margin [7] and is the largest exposed submarine slide in the world [22].

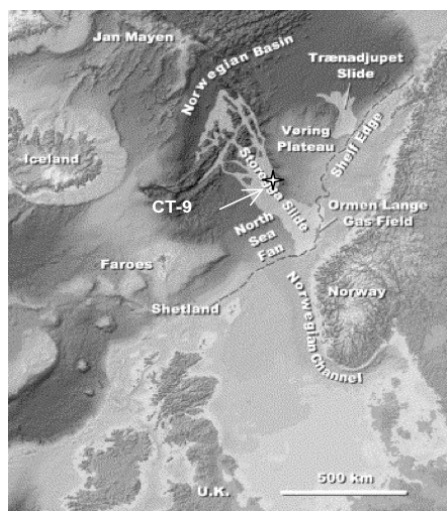


Figure 1. Map of the Storegga Slide at the Norwegian margin, with indication of the sampling area of the push-core CT-9. From Bryn *et al.* [6].

Seismic evidence indicated a strong "Bottom Simulating Reflector" on the northern flank of the slide suggesting the presence of methane hydrates within sediments of the Storegga Slide [6]. Non-tectonic fault systems, as well as other fluid escape structures such as diapirs or pockmarks [25] were also observed in the Storegga Slide, which highlight active fluid circulation. In the Storegga region, these methane-rich fluids support microbial ecosystems, and chemosynthetic populations of symbiotic invertebrates, such as the tube-dwelling *Siboglinidae* [45]. Within the three siboglinid taxa, three major groups are described : the *Monolifera*, the *Frenulata*, long and extremely thin animals and, the *Vestimentifera* or "giant tubeworms" that are the most studied to date [23]. The siboglinids lack a mouth or gut and rely on sulfur- and methane-oxidizing endosymbiotic bacteria in their trophosome for feeding [37, 41, 48]. Biological activity of siboglinids have been shown to modify the surrounding chemical sedimentary environment [12, 14]. Indeed, bioventilation by the worms leads to diffusion of *e.g.* methane, oxygen, and sulfate in the sediments [47]. These compounds are potential electron acceptors and energy sources for the activity of sedimentary prokaryotic communities. For example, methane cold seep sediments typically harbour anaerobic methanotrophs (ANME), that are usually coupled in syntrophy with sulfate-reducing bacteria (SRB) relying on sulfate as an electron acceptor and methane as the carbon source [5].

Molecular analysis based on 16S rRNA genes of *Bacteria* and *Archaea* from sediments associated with macrofauna have tentatively suggested a relationship between the types of prokaryotes found and the animal species. For example, sediments containing the *Calyptogena* bivalve in the Japan Trench showed presence of SRB belonging to the *Deltaproteobacteria*, methanogens affiliated to the order *Methanococcales* and uncultured *Archaea* [34]. Activity rates of anaerobic methane oxidation (AOM) coupled to sulfate reduction were also measured at the base of tubeworms in the Haakon Mosby Mud Volcano (HMMV), off Norway. Furthermore, low aerobic oxidation of methane process was shown to take place in oxygenated sediments associated with the HMMV tubeworms [39]. In addition molecular surveys of sediments populated by siboglinids (of the *Oligobrachia haakonmosbiensis* and *Sclerolinum contortum*), detected uncultured archaeal groups such as ANME-1, MG-I, MBG-C or MBG-B [36]. Teske *et al.* pointed out the potential importance of *Archaea* in deep marine sediments because they mainly consist of uncultured phylogenetic lineages, and that they may be the dominant microbial domain of the deep marine subsurface [53]. Furthermore, several studies attest to the widespread presence of *Archaea* in marine environments [3], which could represent one of the ocean's most abundant cell types [10].

Microbial diversity associated with marine benthic fauna is mostly known in regards of symbiosis. For example, in the nearby sediments of HMMV, Lösekann *et al.* reported presence of chemoautotrophic sulfur-oxidizing symbionts of the *Gammaproteobacteria* harboured by siboglinid tubeworms [37]. However, diversity of free-living microorganisms in sediments closely surrounding fauna is lacking information. Some of the questions raised in this study are, how do sediment archaeal communities profit from the locally modified chemical environment due to biological tubeworm activity? and, how does the tubeworm's activity influence the community structure, distribution and activity of *Archaea*? In order to extend the current knowledge about the diversity of *Archaea* in sediments populated by siboglinids, we analysed the archaeal community composition of sediments hosting *Siboglinidae* tubeworms in the Storegga Slide. Vertical archaeal diversity was assessed by PCR-DGGE fingerprinting of archaeal 16S rRNA genes. The active archaeal community was examined by extracting total RNA, followed by RT-PCR amplification of 16S rRNA genes and analysis of archaeal 16S rRNA gene libraries.

MATERIALS AND METHODS

Sediment sampling, and porewater analysis.

Sediment samples were collected from the North Eastern part of the Storegga Slide situated in the Norwegian continental Margin during the Ifremer Vicking cruise with the research vessel *Pourquoi Pas?* in May-June 2006. Sediment sample CT-9 was recovered during dive PL 275-05 by the remotely operated vehicle (ROV) VICTOR 6000 (Ifremer)-operated push core from 746 metres of water depth (N 64°45.2660, E 004°58.8699). Sediments populated by small sparse patches of tubeworms belonging to the *Siboglinidae* species *Oligobrachia haakonmosbiensis* and *Sclerolinum contortum* were observed in this area. Immediately after retrieval, the sediment core was sectioned aseptically into 2 cm layers in the cold room (4°C) and frozen at -80°C for nucleic acid extraction and analysis. A reference push-core CT-22 was recovered from sediments devoid of Siboglinids in the Nyegga region belonging to the Storegga Slide (N 64°39.9925, E 005°17.3457).

Porewater was obtained by centrifuging approximately 10 g of crude sediment for 15 minutes at 3000 x g at 4°C. The porewater was then stored at -20° until required. Depth distribution of dissolved sulfate and chloride were quantified from diluted porewater using ion exchange chromatography, with a isocratic DX120 ion chromatography system (DIONEX Corporation, Sunnyvale, CA) fitted with Ionpac AS9-SC columns and a suppressor (ASRS-ultra II) unit in combination with a DS4-1 heated conductivity cell. Components were separated using a sodium carbonate gradient, with a flow of 1.5 ml min⁻¹.

Nucleic acid extraction and purification.

Total genomic DNA was directly extracted and purified from 5 g of wet sediment for all sections in duplicate, by using the Zhou *et al.* method with modifications [59]. Sediment samples were mixed with DNA extraction buffer and then frozen in liquid N₂ then thawed at 65°C, 3 times. The pellet of crude nucleic acids obtained after centrifugation, was washed with cold 80% ethanol, and resuspended in sterile deionized water, to give a final volume of 100 µL. Crude DNA extracts were then purified using the Wizard DNA clean-up kit (Promega, Madison, WI). DNA extracts were aliquoted and stored at -20°C until required for PCR amplification. Total RNA was directly extracted and purified from 2g of wet sediment from pooled sediment sections 0 to 6 cmbsf, using the RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MO BIO

Labs. Inc., Carlsbad, CA) according to manufacturer recommendations. Aliquots of RNA extracts were treated by TurboTM DNase (Applied Biosystems, Foster City, CA) and purified using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The quality of RNA samples was examined by agarose-gel electrophoresis and concentrations were determined using spectrophotometry (Nanodrop ND-100, NanoDrop Technologies Wilmington, DE, USA).

PCR-DGGE of archaeal 16S rRNA genes.

Archaeal 16S rRNA genes were amplified by PCR from purified DNA extracts using the archaeal targeted primers pair 8F (5'-CGGTTGATCCTGCCGGA-3') and 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') [9]. All PCR reactions (total volume reaction 25 μ L) contained 1 μ L purified DNA template (1/25 dilution), 1 X PCR buffer (Promega, Madison, WI), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer (Eurogentec) and 0.6 U GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI). Amplification was carried out using the GeneAmp PCR 9700 System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 49°C for 1 min 30 s, and extension at 72°C for 2 min for 30 cycles. All the archaeal 16S rRNA gene PCR products were then re-amplified with primers 340F (5'-CCCTACGGGGYGCASCAG-3') [54] containing a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3') at the 5' end [9] and 519R (5'-TTACCGCGGCKGCTG-3') [40]. The PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 72°C to 62°C (touchdown - 0,5°C.cycle⁻¹) for 30 s, and extension at 72°C for 1 min, for 20 cycles, then denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, for 10 cycles, and a final extension at 72°C for 30 min [29].

To restrict contamination to a minimum, PCR experiments were carried out under aseptic conditions (Captair[®] bio, Erlab, Fisher Bioblock Scientific) using autoclaved and UV-treated plasticware and pipettes, and only sterile nuclease-free molecular grade water (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Positive (DNA extracted from pure cultures) and negative (molecular grade water) controls were used in all PCR amplifications.

DGGE fingerprinting analysis, band excision and sequencing.

DGGE was carried out as described by Webster *et al.* with some modifications [55]. PCR products were separated by DGGE using the D-Gene™ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) on 8% (w/v) polyacrylamide gels (40% acrylamide/bis solution 37.5:1; Bio-Rad Laboratories) with a gradient of denaturant between 20% and 60% [100% denaturant equals 7M urea and 40% (v/v) formamide]. Gels were poured with the aid of a 30 ml volume gradient mixer (Hoefer SG30, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and prepared with 1 X TAE buffer (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Electrophoresis was carried out at 60°C, 200 V for 5 hours (with an initial electrophoresis for 15 min at 80 V) in 1 X TAE buffer. Polyacrylamid gels were stained with SYBRGold nucleic acid gel stain (Invitrogen, San Diego, CA) for 30 min, and viewed using the Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Individual DGGE bands of interest were excised and washed in sterile-nuclease free molecular grade water for 10 min. Bands were then air-dried and crushed in 10-20 µL molecular grade water and incubated overnight at 4°C. The supernatant (1µL) was used as template DNA in a nested PCR using primer set 340F and 519R. The PCR products of excised DGGE bands were sequenced with primer 519R, using an ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the Biogenouest plateform of Roscoff Marine laboratory (France).

Synthesis of cDNA by reverse transcription, PCR amplification and construction of RNA-derived 16S rRNA gene libraries.

RNA-derived cDNA was synthesised by reverse transcription using the 16S rRNA archaeal targeted primer 915R (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3') [8] and the Moloney Murine Leukaemia Virus reverse transcriptase (M-MuLV, MP Biomedicals, Irvine, CA) according to the manufacturer's protocol. Purified RNA was initially denatured by incubating at 65°C for 10 min, and 7.7 µM primer 915R was added to the denatured RNA. The reaction mixture was incubated at 70°C for 10 min. The reverse transcription reaction mixture consisted of 100 to 200 ng of denatured RNA, 1 X M-MuLV buffer, 200 µM of deoxynucleoside triphosphate mix, and 10 mM DTT (dithiothreitol). The reverse transcription reaction mix was incubated at 42°C for 2 min. A 200-unit aliquot of M-MuLV reverse transcriptase was added prior to a 80 min incubation at 42°C that resulted in the transcription of the RNA into complementary DNA (cDNA). The reverse transcriptase reaction was then stopped by heating the

solution at 70°C during 15 minutes. The cDNA end product was used as a template for archaeal 16S rRNA gene based PCR using the following primers: 340F and 915R. The PCR amplification involved 20 cycles each consisting of 94°C for 1 min, 71°C to 61°C (touchdown -1°C.cycle⁻¹) for 1 min, and 72°C for 2 min. The purified RNA extracts that were not reverse-transcribed were amplified by PCR using the same primers, in order to monitor possible DNA contaminations of RNA templates. No contaminating DNA was detected in any of these reactions.

PCR products were purified with the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and analyzed on 1% (w/v) agarose gels run in 1 X TAE buffer stained with ethidium bromide and UV-illuminated. Purified PCR products were cloned into TOPO[®] XL PCR Cloning Kit, and transformed into *Escherichia coli* TOP10 One Shot[®] cells (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's recommendations.

Phylogenetic analysis of RNA-derived 16S rRNA genes.

The gene sequencing was performed by *Taq* cycle sequencing and determined on a ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the M13R primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Sequences were analyzed using the NCBI BLAST search program within GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) [2]. The presence of chimeric sequences in the clone libraries was determined with the CHIMERA CHECK program of the Ribosomal Database Project II (Center for Microbial Ecology, Michigan State University, <http://wdc.mnsc.nig.ac.jp/RDP/html/analyses.html>). Potential chimeras were eliminated before phylogenetic trees were constructed. The RNA-derived 16S rRNA gene sequences were then edited in the BioEdit v7.0.5 program [24] and aligned using the SINA Webaligner (<http://www.arb-silva.de/>). Sequence data were analysed with the MEGA4.0.2 program [52]. The phylogenetic trees were calculated by the neighbour-joining analysis. The robustness of inferred topology was tested by bootstrap resampling (1000).

Rarefaction curves were calculated for each 16S rRNA cDNA clone library using the RarFac program (<http://www.icbm.de/pmbio>). An 85% similarity level was used to define the phylogenetic lineages because of the low sequence similarity between the archaeal 16S rRNA gene sequences due to high intralinear depth of many of the uncultured archaeal groups identified in this study. Gene library coverage was

calculated using the following formula: $C=[1-(n_1/N)]*100$, where n_1 is the number of unique OTUs, and N is number of clones in the library [46].

Statistical analyses of DGGE banding patterns.

The DGGE profile was analyzed as described by Fry *et al.* [17], using a presence/absence scoring of the DGGE bands. After making a grid to determine whether bands were present (score=1) or absent (score=0) for each lane on a same line of the DGGE profile, a presence/absence matrix was obtained. This matrix was then used to build a similarity matrix based on the Jaccard coefficient, using the vegan package within the R software [43]. Finally, a dendrogram was obtained using the Ward agglomeration method within the hierarchical clustering package of the R software.

Nucleotide sequence accession numbers.

The sequence data reported here will appear in GenBank nucleotide sequence database under the accession no. GU055837 to GU055919 for RNA-derived 16S rRNA gene sequences and GU055920 to GU055932 for DNA-derived 16S rRNA gene DGGE band sequences.

RESULTS and DISCUSSION

Biogeochemical characteristics of the siboglinid habitat in the Storegga Slide sediments.

On the North East of the submarine Storegga Slide scar, pockmarks and subsurface chimney structures are populated by macrofaunal colonies of siboglinid tubeworms [38], indicating active chemosynthesis based on methane and sulfur fluxes [4]. Two species have been identified in the Storegga Slide sediments and they represent the dominant fauna: *S. contortum* and *O. haakonmosbiensis* [38]. These species may harbour both chemoautotrophic sulfur-oxidizing and/or methane-oxidizing symbionts [37]. Core CT-9 was populated with a few specimens of *O. haakonmosbiensis* and *S. contortum*, and although chitin bodies were clearly present, their length was difficult to measure as most of them were broken during core retrieval. However, it could be observed that they were at least 30 cm long (A. Anersen, pers. comm.) and sometimes exceeded 70 cm [38], and since the sediment core measured 17 cm, our

study focused on sediments associated with the anterior part and trunk of the tubeworms, and did not include their roots.

The chloride porewater concentration profile (Fig. 2) was irregular, ranging from 356 mM at 6-8 cmbsf to 533 mM at 8-10 cmbsf. The low chloride concentration measured at the 6-8 cmbsf section, could be explained by possible destabilisation of gas hydrates in the Storegga Slide during sample recovery [13]. In sediments with ascending methane fluxes, sulfate diffuses downwards until depletion due to prokaryotic sulfate reduction, while methane diffuses upwards.

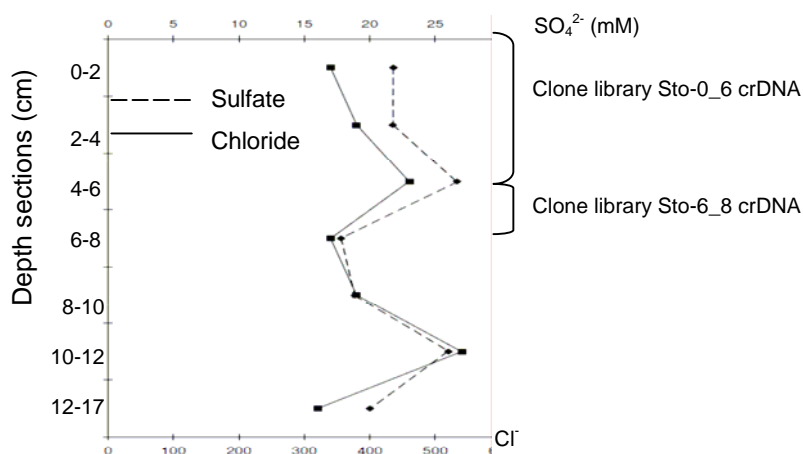


Figure 2. Sulfate and chloride porewater profiles for push-core CT-9 of the Storegga Slide sediments.

Porewater sulfate concentrations in a reference core devoid of siboglinids recovered from the Nyegga region showed a continuous decrease in sulfate with depth reaching 7 mM at 10 cmbsf depth (data not shown). In the Storegga Slide sediments, sulfate porewater concentrations profile was irregular and did not show depletion with depth (Fig. 2). Concentrations ranged from 16 mM at 2 cmbsf to 27 mM at 4 cmbsf depths. A similar irregular aspect of porewater sulfate concentrations was observed in sediments populated by siboglinids in the HMMV [39]. Hence, both irregular aspects of the chloride and sulfate porewater concentrations could be due to the worms' bioturbation.

Methane concentrations measured in the Storegga Slide water column a few cms above the Siboglinid patches were low, i.e. < 0.45 μ M (J-C Caprais, pers. comm.) and were inferior to the methane concentrations measured previously in siboglinid fields of the HMMV (0.7 μ M; [39]). Moreover, our molecular surveys failed to detect methanogens and/or ANME sequences suggesting that these microorganismes are below the detection limits or absent from these sediment layers. Indeed, *mcrA* genes,

markers targeting methanogens and anaerobic methanotrophs, could not be amplified from DNA templates retrieved from all the Storegga Slide sediment sections (0 to 17 cmbsf) despite many PCR attempts using different conditions (data not shown). The irregular sulfate profile and absence of methanotrophic affiliated sequences in the entire sediment core could indicate, as previously mentioned by Lösekann *et al.* [36], that maximum AOM coupled to sulfate removal occurred at the base of the tubeworms where sulfate and methane are both available. Indeed, in siboglinid fields of the HMMV, ANME aggregates (consisting of ANME-3) were only localised at the base of the tubeworms between 60 and 80 cmbsf depth, which correlated to the length of the chitin tube. Unfortunately push core sampling in our study did not recover sediment at the base of the siboglinid tubeworms and this comparison could not be undertaken.

Vertical distribution of the archaeal communities in the Storegga Slide sediments.

The DGGE fingerprints (Fig. 3A) generated from DNA samples extracted from sediment layers associated with siboglinid tubeworms displayed 9 single major bands from 0 to 17 cmbsf depth. All phylotypes were related to environmental clones associated with marine and lake sediments (Table 1). Two prominent bands (Fig. 3A), named Sto-dggeB6 and Sto-dggeB6b (sequences undetermined), which were present from 6 to 17 cmbsf depth and absent from the top sediment depth demonstrated a change in archaeal diversity with depth. Band Sto-dggeB7 displayed 82% similarity to clone LAa29.68 belonging to the Euryarchaeotal Rice Cluster V (RC-V), from the anoxic water layers of an Arctic lake [42]. DGGE band sequences Sto-dggeB1 to -B5, -B7 to -B10, and -B12 were all related to the Crenarchaeotal Marine Group I (MG-I), which was distributed throughout the whole core [42]. In addition DGGE band sequences Sto-dggeB11, detected at 12-17 cmbsf depth and Sto-dggeB13, which appears in sections 6 to 17 cmbsf as identified by extrapolation of DGGE band position, were related to the Euryarchaeotal Marine Benthic Group D (MBG-D) with 78% and 89% sequence similarity respectively (Table 1). The DGGE profile was analyzed by statistical clustering. The resulting dendrogram (Fig. 3B) of the DGGE pattern highlighted 2 separate clusters. The first cluster grouped depths 0 to 6 cmbsf, and the second cluster grouped depths 6 to 17 cmbsf, which suggests a clear change in the archaeal diversity populations with sediment depth.

Phylogenetic affiliation	DGGE band	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)	
<i>Crenarchaeota</i> MG-I	Sto-dggeB1 (0-2 cmbsf)	ES0303-A2 (FJ437685) Manganese nodules from China, Eastern Pacific Ocean	75	
	Sto-dggeB2 (0-2 cmbsf)	ALOHA200m_0045 (EF106855) Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre	78	
	Sto-dggeB3 (0-2 cmbsf)	CRA20-0cm (AF119130) Deep-sea sediments, Atlantic Ocean	81	
	Sto-dggeB4 (0-2 cmbsf)	CRA36-0cm (AF119131) Deep-sea sediments, Atlantic Ocean	86	
	Sto-dggeB5 (2-4 cmbsf)	ES0303-A2 (FJ437685) Manganese nodules from China, Eastern Pacific Ocean	91	
	Sto-dggeB7 (8-10 cmbsf)	CRA20-0cm (AF119130) Deep-sea sediments, Atlantic Ocean	83	
	Sto-dggeB8 (8-10 cmbsf)	ES0303-A2 (FJ437685) Manganese nodules from China, Eastern Pacific Ocean	88	
	Sto-dggeB9 (10-12 cmbsf)	SPG11_H2O_A103 (FJ487488) Abyssal marine sediments, South Pacific Gyre	93	
	Sto-dggeB10 (10-12 cmbsf)	CRA36-0cm (AF119131) Deep-sea sediments, Atlantic Ocean	93	
	Sto-dggeB12 (12-17 cmbsf)	HSA-F11 (EU347155) Tropical urban Guanabara Bay, Brazil	82	
	<i>Euryarchaeota</i> MBG-D	Sto-dggeB11 (12-17 cmbsf)	EJ1-50 (EF591427) Sediments, East Sea of Korea	78
		Sto-dggeB13 (12-17 cmbsf)	BS1-1-69 (AY396640) Tidal flat sediments, Ganghwa Island	89
RC-V	Sto-dggeB6 (6-8 cmbsf)	LAa29.68 (EU750888) Meromictic High Arctic lakes	82	

Table 1. Closest 16S rRNA gene sequences matches to the excised dominant DGGE bands using the NCBI BLASTN search.

Using the results from this cluster analysis representative 16S rRNA gene libraries of each cluster were constructed from reverse-transcribed RNA to see if there was also a shift in the metabolically active archaeal diversity with depth. Total RNA was extracted from two different sediment sections (0-6 and 6-8 cmbsf) from the siboglinid associated sediments of the Storegga Slide. RNA was of sufficient quantity (28 and 38 ng.μL⁻¹ respectively) to be reverse-transcribed, amplified with 16S rRNA gene specific PCR primers, and cloned. A total of 49 *Archaea* RNA-derived 16S rRNA gene sequences from sediments depths 0 to 6 cmbsf, and 36 *Archaea* clones from sediments depths 6 to 8 cmbsf were analysed. Percentage coverage and rarefaction curves were calculated. Rarefaction curves generated for cDNA clones obtained from both sections indicated saturation (*Supplementary material. SM1*), while percentage coverage was determined to be 74% for the 0 to 6 and clone library and 61% for the 6 to 8 cmbsf clone library. The common archaeal phylotypes, based on the RNA-derived 16S rRNA gene analysis, present at the two depths layers were *Crenarchaeota* (Fig. 4A) dominated by MG-I and Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG), and *Euryarchaeota* (Fig. 4B) with a majority of RC-V members.

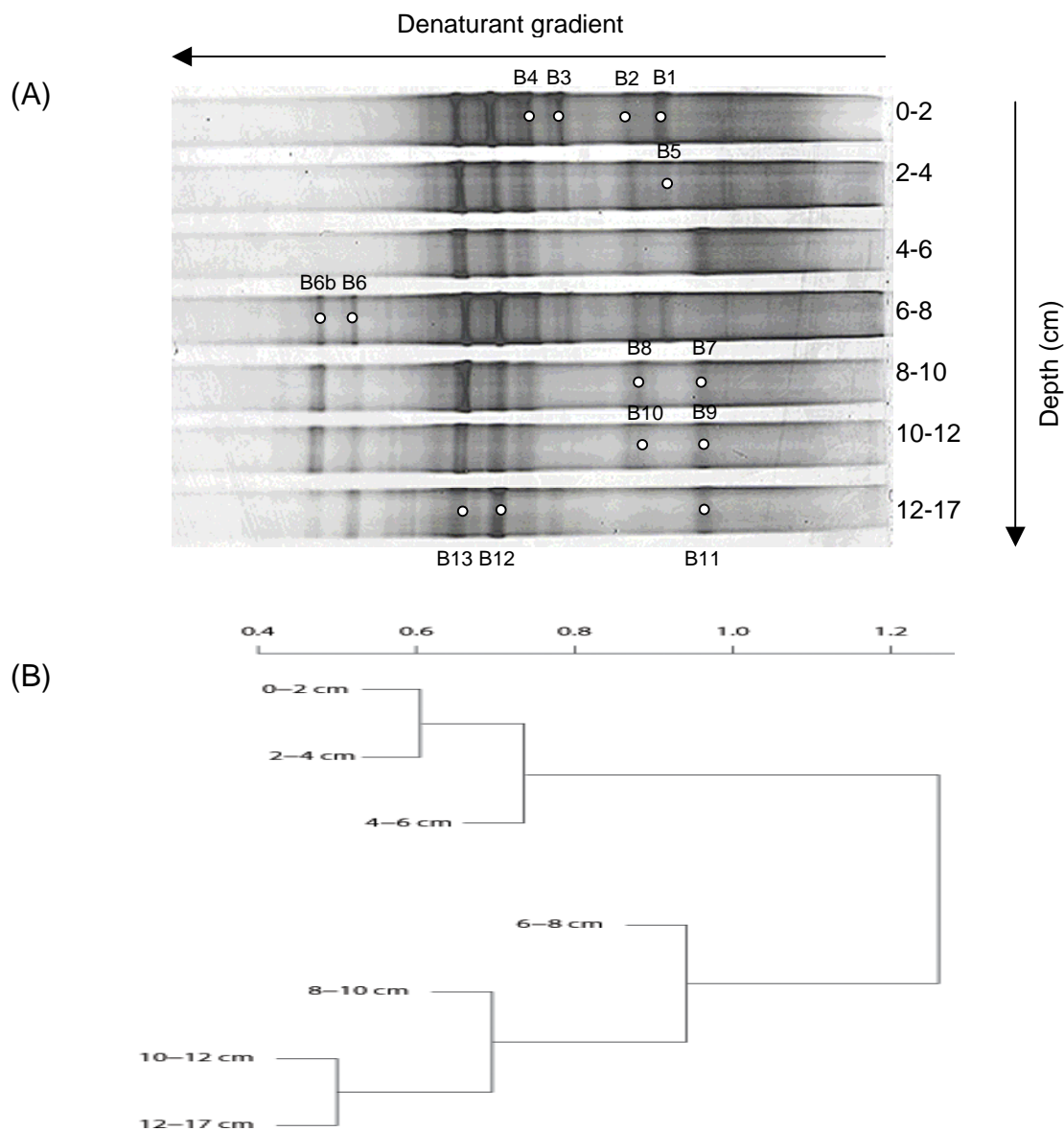


Figure 3: A) DGGE analysis of Archaeal 16S rRNA gene sequences from various sediment depths at the Storegga Slide by nested PCR. Marked DGGE bands (white dot) were excised and sequenced. Numbers B1 to B14 are bands corresponding to Sto-dggeB1 to Sto-dggeB14. B) Dendrogram from cluster analysis of DGGE banding profiles and scoring bands as present or absent, using the R software. Bar indicates dissimilarity values.

The MG-I Storegga Slide clones are closely affiliated with MG-I clones retrieved previously from siboglinid populated sediments of the HMMV [36]. The detection of these uncultivated archaeal groups in reverse-transcribed 16S rRNA gene libraries indicates that MG-I, MCG and RC-V are metabolically active in the sediments populated by siboglinids. Interestingly, substantial differences existed in the metabolically active archaeal community between the two sediment layers analysed (*Supplementary material. SM2*). Overall, the RC-V was the most dominant archaeal group retrieved from the Storegga sediments analyzed, and was found in both 0-6

and 6-8 cmbsf depth clone libraries. In addition, three other archaeal groups, the Terrestrial Miscellaneous Euryarcheotal Group (TMEG, [51]), the Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 4 (DHVE-4, [50]) and the Sippenauer Moor Group 1 (SM1, [44]), were also detected in both clone libraries. Three other uncultured archaeal groups were also found in the 0-6 cmbsf clone library (MG-I, the Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal Group 6 (DHVE-6) and the Marine Benthic Group E (MBG-E)) and five were found in the 6-8 cmbsf clone library (MCG, the Lake Dagow Sediment group (LDS, [20]), the Val Kotinen Lake clade III group (VAL III, [31]), the "Unknown Euryarchaeota group VI" (Group VI, [32]) and the MBG-D).

Tubeworms living at cold seeps have specific adaptation to sedimentary habitats, with a part of their long body and tube extending into the seawater-sediment interface [4]. Therefore they are channels between deep reduced sediment layers and the oxygenated water, thus extending oxic sediment layers for aerobic bacteria [14]. Dando *et al.* also suggested that oxygen can diffuse from the blood system of the animals, across the body and tube wall into the surrounding sediment [14]. Moreover, the results from the Storegga Slide sediment molecular survey (using both PCR-DGGE and gene library constructions) provide evidence of a shift in the vertical distribution of the archaeal community composition with depth. This is in contrast with RNA-derived 16S rRNA gene libraries carried out on sediments from the reference Nyegga region without siboglinids, showing mainly ANME affiliated sequences (data not shown).

The RC-V was found to be the most abundant active *Euryarchaeota* in clone libraries (Fig. 4B). Whereas only one band affiliated with the RC-V was detected by PCR-DGGE in the 8-10 cmbsf section. It is therefore possible that RC-V members might represent a small proportion of the total archaeal community in the shallow sediments, but appear to be more active within the whole core. However, differences could also be explained by the different PCR reverse primers used for the DGGE analysis and the gene library analysis. It is possible that these two primer sets did not select and amplify the same populations. And, it has been previously shown that molecular analysis are inherently biased [49].

(A)

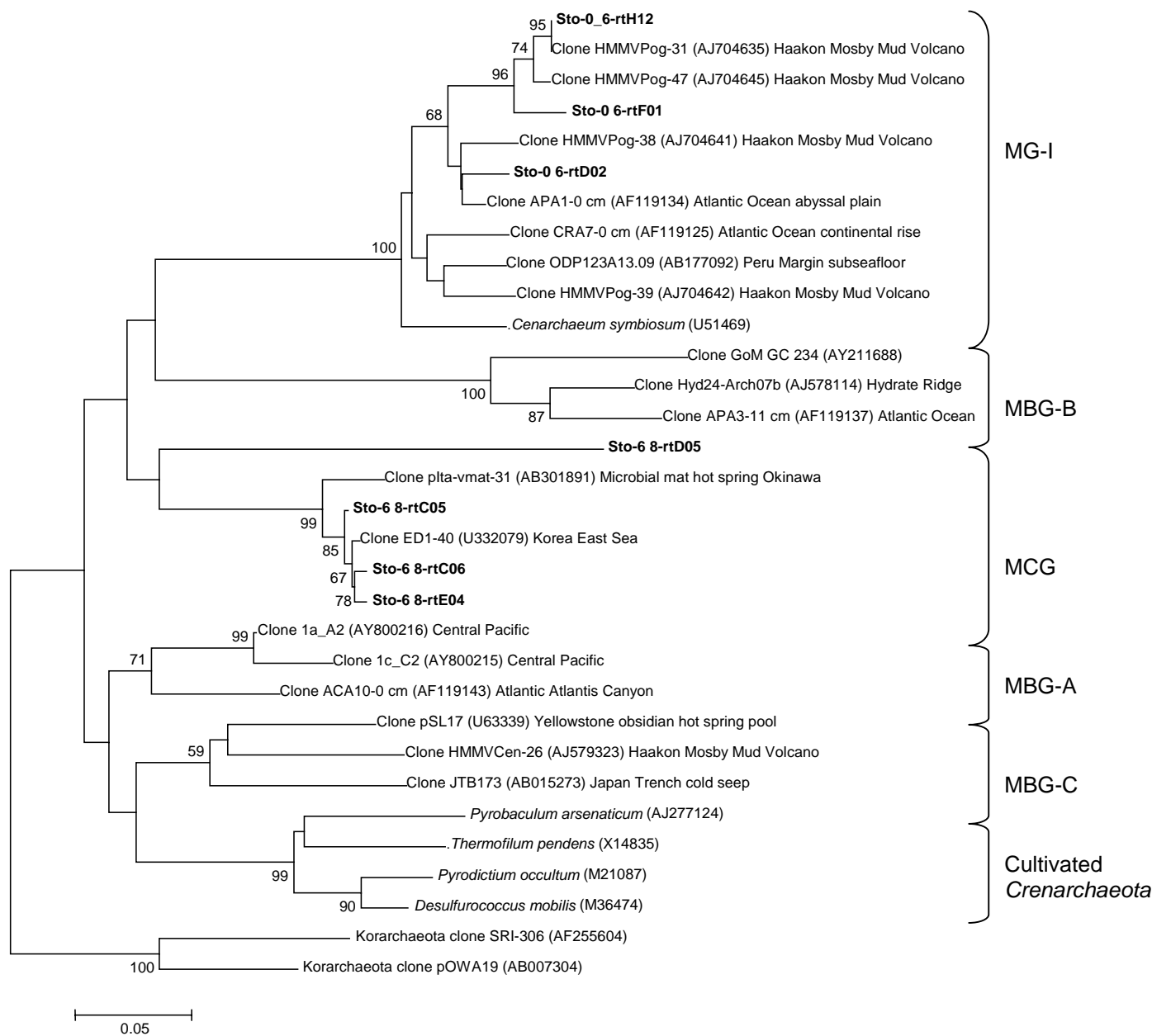
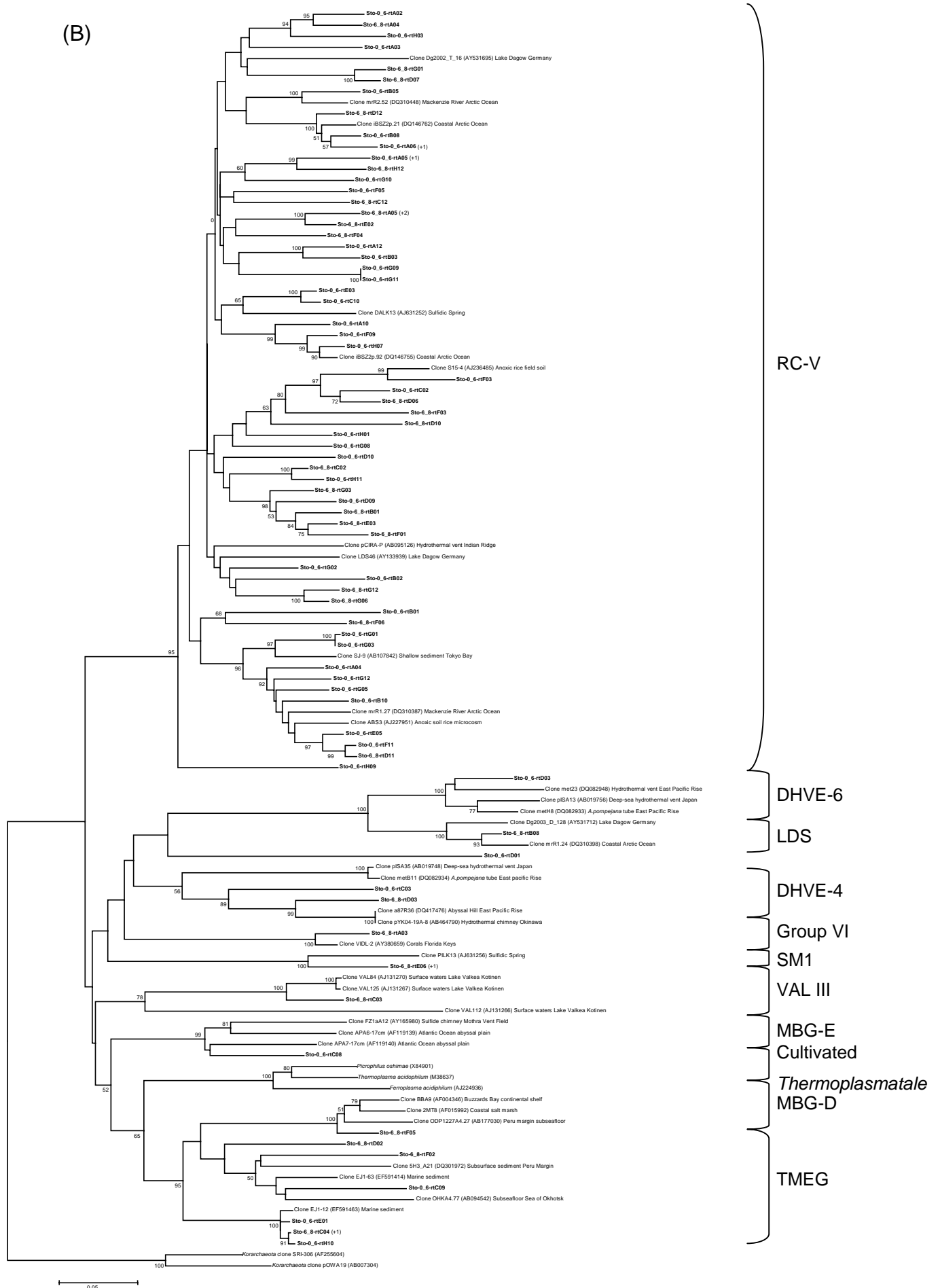


Figure 4. A) Distance tree showing the affiliations of Storegga Slide *Crenarchaeota*-related 16S rRNA genes. B) Distance tree showing the affiliations of Storegga Slide *Euryarchaeota*-related 16S rRNA genes. Both trees were calculated with approximately 575 bp by neighbour-joining analysis. Bootstrap values (in percent) are based on 1000 replicates and are indicated at nodes for branches values $\geq 50\%$ bootstrap support. Clone sequences from Storegga Slide sediments are in boldface type. Clones with designation beginning Sto-0_6 are from section 0 to 6 cmbsf sediments, and clones with designation Sto-6_8 are from section 6 to 8 cmbsf sediments. The bar indicates 5% estimated phylogenetic divergence. Numbers in brackets indicate the number of analyzed clones that have more than 97% sequence similarity.

(B)



The RC-V are phylogenetically diverse and were originally detected in anoxic rice paddies [21] dominated by methanogens. RC-V sequences have also been observed in other non-marine environments such as a freshwater Arctic river [18], temperate and meromictic lakes [20, 42], suggesting diverse metabolic characteristics and physiologies [18]. In addition, identification of the dominant bands of the DGGE gel shows that MG-I were present throughout the whole core. However, differences in DNA and RNA-derived signatures suggest that MG-I members were not active in the deeper sediments (6-8 cmbsf), or that the active fraction of the MG-I was below detection limits in the deeper sediments. Previously MG-I sequences were mainly found in the water column and the oxic sediment interfaces [16, 53]. Recently, evidence strongly supports the hypothesis that some *Crenarchaeota* belonging to some members of the MG-I carry out aerobic, autotrophic ammonia oxidation [33, 42]. Presence of active MG-I in shallow (0-6 cmbsf) sections, suggest penetration of oxygen which would be necessary for ammonia oxidation in these sediment layers, which is in agreement with the increased *in situ* depth penetration of oxygen measured in HMMV sediments (3 to 10 cmbsf) due to presence of siboglinids [15].

The statistical scoring analysis of the DGGE profile showed two separate clusters, one grouping depths sections 0 to 6 cmbsf, and the second from 6 to 17 cmbsf. Within the second cluster, the 6-8 cmbsf section was distinct from the others. Moreover, visual observation of the fingerprinting profile shows that 2 major bands appear below 6 cmbsf including sequence belonging to the RC-V and closely related to clone LAa29.68, detected in a cold anoxic meromictic lake, and presumed to be specifically adapted to anoxic conditions [42]. Thus, a shift in the archaeal community structure likely occurred at 6 cmbsf depth. At this depth, sulfate and chloride concentrations do not vary significantly, suggesting that other environmental factors, impacted on the microbial structure. Furthermore, the active archaeal communities (i.e. MG-I, DHVE-6, and MBG-E) found within the 0-6 cmbsf sediment section supposed to be oxygenated have been mainly detected in oxic water columns. In contrast, the active archaeal groups (i.e. MCG, LDS, VAL III, Group VI, and MBG-D) only found in the 6-8 cmbsf section, presumably oxygen depleted, were mostly isolated from anoxic sulfate-rich sediments or oxycline layers of seawater [26-28, 31, 42, 54]. Moreover, in a study of freshwater sediments, Alm *et al.* suggested that non-methanogenic *Archaea* compose the major fraction of the archaeal community at the oxic/suboxic boundary [1].

Influence of the tubeworms' activity on the distribution of the active sedimentary archaeal community.

The occurrence and activity of the tubeworms probably modified the sediment geochemistry thereby influencing the development of the archaeal sedimentary populations. Also the Siboglinids have been thought to "leak" throughout their thin chitin tube molecules such as sulfide [15, 30], sulfate, methane, oxygen [47], ammonia, nitrite [19] and glycogen [48]. Therefore sediments immediately surrounding the worms could provide alternative niches for the activity of indigenous microbial communities. Geochemical zonations of oxidants could be disturbed by the bioventilation of the animals, and could lead to a reorganization in the structure of the archaeal sedimentary communities.

One striking feature of this study was the high diversity of metabolically active *Archaea* in the *Siboglinidae*-populated sediments, including dominant RC-V sequences unusual for cold seep ecosystems. To our knowledge, there has been no previous reporting that RC-V *Archaea* are present and active at cold seeps. Hence the habitat range of this group seems to be broader than originally thought. However, the RC-V, and LDS have previously been detected in environments with high organic contents and it has been suggested that these archaeal groups are linked to detrital decomposition [18], pointing to a possible chemoorganotrophic metabolism [35]. Furthermore, the RC-V were detected in anoxic rice paddy fields, associated to the rice roots [21, 56]. One possible common feature between sediments surrounding the plant roots and the tubeworms is organic exudates, supporting the hypothesis of an organotrophic metabolism. Also, the RC-V are found in habitats where methanogenesis occurs [11, 56-58]. The sediments in the vicinity of the worms could be locally enriched in methane and organic carbon as discussed by Sommer *et al.*[47], suggesting that the RC-V are dependent on carbon from methane cycling. Indeed, methane-rich fluids entering the tubes likely diffuse into the oxic sediment and stimulate local microbial activity. The methane concentrations in the Storegga Slide water column suggest a relatively high methane concentration in the sediments below, and it could be assumed that the presence of tubeworms within the sediment physically increased the flux of methane upwards [47]. Furthermore the active MCG members, detected in the 6-8 cmbsf section, have been proposed to use methane-derived carbon without assimilating directly [3].

Conclusion.

Siboglinids in the Storegga Slide sediments provide a suitable habitat for diverse active prokaryotic communities by impacting on the sediment geochemical gradients. They increase the availability of energy sources, electron donors and acceptors, for microbial activities. Indeed, presence of the worms could also have oxygenated the first few centimetres of sediment layers, hence explaining a shift in archaeal community distribution and a high diversity of metabolically active *Archaea*. Thus, studies of the association and interaction between benthic fauna and sedimentary prokaryotes should be an interesting field of future study. Hence, further work on microbial populations harbouring sediments populated by tubeworms could help solve the fascinating problems raised by studies of the cold seep benthic siboglinids.

Acknowledgements.

We would like to thank Hervé Nouzé the chief scientist of the VICKING cruise, the ROV team, the officers and crew of the RV *Pourquoi Pas?* as well as the shipboard scientific community for their help at sea. We would also like to thank Bénédicte Ritt for her very helpful discussions about the *Siboglinidae* tubeworms, and Gordon Webster for helpful scientific comments (Cardiff University). This work was funded by the HERMES project Contract No: GOCE-CT-2005-511234-1 and by the ANR Deep Oasis.

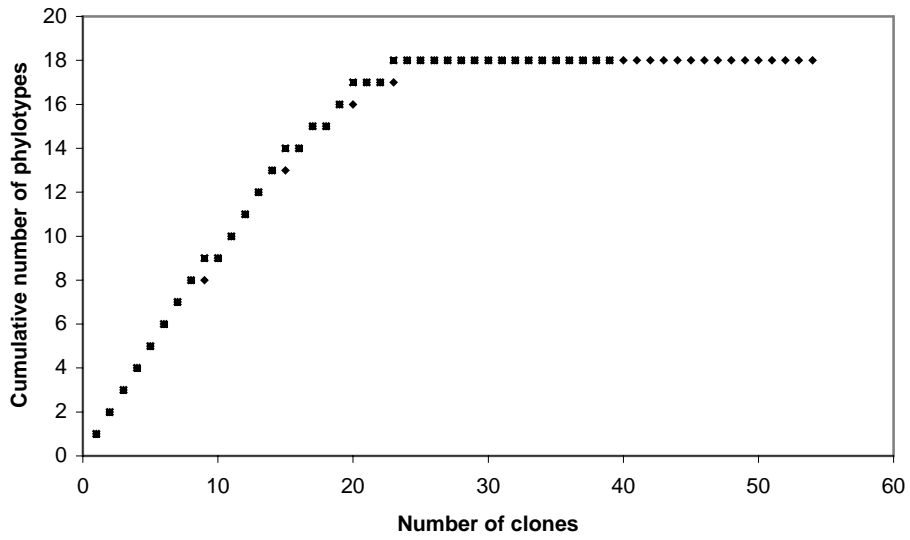
REFERENCES.

1. Alm EW, and Stahl, DA. (2000). Critical factors influencing the recovery and integrity of rRNA extracted from environmental samples: use of an optimized protocol to measure depth-related biomass distribution in freshwater sediments. *J Microbiol Methods* 40:153–162.
2. Altschul SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW, and Lipman, DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
3. Biddle Jf, Lipp, JS, Lever, MA, Llyod, KG, Sorensen, KB, Anderson, R, Fredricks, HF, Elvert, M, and al., e. (2006). Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3846-3851.
4. Boetius A. (2005). Microfauna–Macrofauna Interaction in the Seafloor: Lessons from the Tubeworm. *PLoS Biol* 3:375-378.
5. Boetius A, Ravensschlag, K, Schubert, CJ, Rickert, D, Widdel, F, Gieske, A, and al, e. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407:623-626.
6. Bünz S, Mienert, J, and Berndt, C. (2003). Geological controls on the Storegga gas-hydrate system of the mid-Norwegian continental margin. *Earth Planet Sci Lett* 209:291-307.
7. Bünz S, Mienert, J, Brynw, P, and Bergw, K. (2005). Fluid flow impact on slope failure from 3D seismic data: a case study in the Storegga Slide. *Basin Research* 17:109-122.
8. Casamayor EO, Massana, R, Benlloch, S, Ovreas, L, Diez, B, Goddard, VJ, Gasol, JM, Joint, I, and al., e. (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* 4:338-348.
9. Casamayor EO, Schäfer, H, Baneras, L, Salio, CP, and Muyzer, G. (2000). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66:499-508.
10. Chaban B, Ng, SYM, and Jarrell, KF. (2006). Archaeal habitats — from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* 52:73–116.
11. Chan OC, Claus, P, Casper, P, Ulrich, A, Lueders, T, and Conrad, R. (2005). Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ Microbiol* 7:1139-1149.
12. Cordes EE, Bergquist, DC, Shea, K, and Fisher, CR. (2003). Hydrogen sulphide demand of long-lived vestimentiferan tube worm aggregations modifies the chemical environment at deep-sea hydrocarbon seeps. *Ecol Lett* 6:212–219.

13. Dählmann A, and de Lange, GJ. (2003). Fluid-sediment interactions at Eastern Mediterranean mud volcanoes: a stable isotope study from ODP Leg 160. *Earth Planet Sci Lett* 212:377-391.
14. Dando PR, Southward, AJ, Southward, EC, Lamont, P, and Harvey, R. (2008). Interactions between sediment chemistry and frenulate pogonophores (Annelida) in the north-east Atlantic. *Deep Sea Res Part I* 55:966– 996.
15. De Beer D, Sauter, E, Niemann, H, Kaul, N, Foucher, J-P, Witte, U, Schlüter, M, and Boetius, A. (2006). In situ fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Haakon Mosby Mud Volcano. *Limnol Oceanogr* 51:1315-1331.
16. DeLong EF. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5685-5689.
17. Fry JC, Webster, G, Cragg, BA, Weightman, AJ, and Parkes, RJ. (2006). Analysis of DGGE profiles to explore the relationship between prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiol Ecol* 58:86-98.
18. Galand PE, Lovejoy, C, and Vincent, WF. (2006). Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquat Microb Ecol* 44:115-126.
19. Girguis PR, Lee, RW, Desaulniers, N, Childress, JJ, Pospesil, M, Felbeck, H, and Zal, F. (2000). Fate of Nitrate Acquired by the Tubeworm *Riftia pachyptila*. *Appl Environ Microbiol* 66:2783–2790.
20. Glissmann K, Chin, K-J, Casper, P, and Conrad, R. (2004). Methanogenic Pathway and Archaeal Community Structure in the Sediment of Eutrophic Lake Dagow: Effect of Temperature. *Microb Ecol* 48:389-399.
21. Grosskopf R, Stubner, S, and Liesack, W. (1998). Novel Euryarchaeotal Lineages Detected on Rice Roots and in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. *Appl Environ Microbiol* 64:4983-4989.
22. Hafidason H, Sejrup, HP, Nygard, A, Mienert, J, Bryn, P, Lien, R, Forsberg, CF, Berg, K, and Masson, D. (2004). The Storegga slide: architecture, geometry and slide development. *Mar Geol* 213:201-234.
23. Halanych KM. (2005). Molecular phylogeny of siboglinid annelids (a.k.a. pogonophorans): a review. *Hydrobiologia* 535/536:297–307.
24. Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98.
25. Hovland M, Svensen, H, Forsberg, CF, Johansen, H, Fichler, C, Fossa, JH, Jonsson, R, and Rueslatten, H. (2005). Complex pockmarks with carbonate-ridges off mid-Norway: products of sediment degassing. *Mar Geol* 218:191-206.
26. Huber JA, Butterfield, DA, and Baross, JA. (2002). Temporal Changes in Archaeal Diversity and Chemistry in a Mid-Ocean Ridge Seafloor Habitat. *Appl Environ Microbiol* 68:1585-1594.
27. Inagaki F, Nunoura, T, Satoshi, N, Teske, A, Lever, M, Lauer, A, Suzuki, M, Takai, K, Delwiche, M, and al., e. (2006). Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2815-2820.
28. Inagaki F, Suzuki, M, Takai, K, Oida, H, Sakamoto, T, Aoki, K, Nealson, KH, and Horikoshi, K. (2003). Microbial Communities Associated with Geological Horizons in Coastal Seafloor Sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl Environ Microbiol* 69:7224-7235.
29. Janse I, Bok, J, and Zwart, G. (2004). A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 57:279– 281.
30. Julian D, Gaill, F, Wood, E, Arp, AJ, and Fisher, CR. (1999). Roots as a site of hydrogen sulfide uptake in the hydrocarbon seep vestimentiferan *Lamellibrachia* sp. *J Exp Biol* 202:2245–2257.
31. Jurgens G, Glöckner, F-O, Amann, R, Saano, A, Montonen, L, Likolammi, M, and Münster, U. (2000). Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiol Ecol* 34:45-56.
32. Kellogg CA. (2004). Tropical Archaea: diversity associated with the surface microlayer of corals. *Mar Ecol Prog Ser* 273:81-88.
33. Könneke M, Bernhard, AE, de la Torre, JR, Walker, CB, Waterbury, JB, and Stahl, DA. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543-546.
34. Li L, Kato, C, and Horikoshi, K. (1999). Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench. *Marine biotechnology* 1:391-400.
35. Liros M, Casamayor, EO, and Borrego, C. (2008). High archaeal richness in the water column of a freshwater sulfurous karstic lake along an interannual study. *FEMS Microbiol Ecol* 66:331–342.
36. Lösekann T, Knittel, K, Nadalig, T, Fuchs, B, Niemann, H, Boetius, A, and Amann, R. (2007). Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol* 73:3348-3362.
37. Lösekann T, Robador, A, Niemann, H, Knittel, K, Boetius, A, and Dubilier, N. (2008). Endosymbioses between bacteria and deep-sea siboglinid tubeworms from an Arctic Cold Seep (Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea). *Environ Microbiol* 10:3237–3254.
38. Meunier C, Andersen, AC, Bruneaux, M, Le Guen, D, Terrier, P, Leize-Wagner, E, and Zal, F. (2009). Structural characterization of hemoglobins from Monilifera and Frenulata tubeworms (Siboglinids): First discovery of giant hexagonal-bilayer hemoglobin in the former "Pogonophora" group. *Comp Biochem Physiol A*.
39. Niemann H, Lösekann, T, de Beer, D, Elvert, M, Nadalig, T, Knittel, K, Amann, R, Sauter, EJ, Schlüter, M, Klages, M, Foucher, J-P, and Boetius, A. (2006). Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* 443:854-858.
40. Ovreas L, Forney, L, Daae, FL, and Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:3367-3373.
41. Pimenov NV, Savvichev, AS, Rusanov, II, Lein, AY, and Ivanov, MV. (2000). Microbiological processes of the carbon and sulfur cycles at cold methane seeps of the north Atlantic. *Microbiology* 69:831-843.
42. Pouliot J, Galand, PE, Lovejoy, C, and Vincent, WF. (2009). Vertical structure of archaeal communities and the distribution of ammonia monooxygenase A gene variants in two meromictic High Arctic lakes. *Environ Microbiol* 11:687–699.
43. R Development Core T. (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
44. Rudolph C, Moissl, C, Henneberger, R, and Huber, R. (2004). Ecology and microbial structures of archaeal/bacterial strings-of-pearls communities and archaeal relatives thriving in cold sulfidic springs. *FEMS Microbiol Ecol* 50:1-11.
45. Sibuet M, and Olu, K. (1998). Biogeography, biodiversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins. *Deep Sea Res Part II* 45:517-567.

46. Singleton DR, Furlong, MA, Rathbun, SL, and Whitman, WB. (2001). Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* 67:4374–4376.
47. Sommer S, Linke, P, Pfannkuche, O, Schleicher, T, Schneider v. Deimling, J, Reitz, A, Haeckel, M, Flögel, S, and Hensen, C. (2009). Seabed methane emissions and the habitat of frenulate tubeworms on the Captain Arutyunov mud volcano (Gulf of Cadiz). *Mar Ecol Prog Ser* 382:69–86.
48. Southward EC, Schulze, A, and Gardiner, SL. (2005). Pogonophora (Annelida): form and function. *Hydrobiologia*:227–251.
49. Suzuki M, and Giovannoni, SJ. (1996). Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR†. *Appl Environ Microbiol* 62:625–630.
50. Takai K, and Horikoshi, K. (1999). Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments. *Genetics* 152:1285-1297.
51. Takai K, Moser, DP, DeFlaun, M, Onstott, TC, and Frederickson, JK. (2001). Archaeal Diversity in Waters from Deep South African Gold Mines. *Appl Environ Microbiol* 67:5750-5760.
52. Tamura K, Dudley, J, Nei, M, and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24::1596–1599.
53. Teske A, and Sorensen, KB. (2008). Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all ? *ISME J* 2:3-18.
54. Vetriani C, Jannasch, HW, J, MB, Stahl, DA, and Reysenbach, A-L. (1999). Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microbiol* 65:4375-4384.
55. Webster G, Newberry, CJ, Fry, JC, and Weightman, AJ. (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of microbiological methods* 55:155-164.
56. Wu L, Ma, K, Li, Q, Ke, X, and Lu, Y. (2009). Composition of Archaeal Community in a Paddy Field as Affected by Rice Cultivar and N Fertilizer. *Microb Ecol* 58:819–826.
57. Ye W, Liu, X, Lin, S, Tan, J, Pan, J, Li, D, and Yang, H. (2009). The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiol Ecol* 70:263–276.
58. Zepp Falz K, Holliger, C, Grosskopf, R, Liesack, W, Nozhevnikova, AN, Müller, B, Wehrli, B, and Hahn, D. (1999). Vertical Distribution of Methanogens in the Anoxic Sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl Environ Microbiol* 65:2402–2408.
59. Zhou J, Bruns, MA, and Tiedje, JM. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62:316-322.

SUPPLEMENTARY MATERIAL



SM1. Rarefaction analysis of the RNA-derived 16S rRNA gene libraries, done using the RarFac program. ♦ 0-6 cmbsf section gene library; ■ 6-8 cmbsf section gene library.

Phylogenetic affiliation	Clone	Closest uncultured relative (accession number) and origin	Sequence similarity (%)	
<i>Crenarchaeota</i> MG-I	Sto-0_6-rtD02	OHKA3.34 (AB094533) Coastal seafloor sediments, Sea of Okhotsk	98	
	Sto-0_6-rtF01	Antarctic Sponge clone 2 (AY320199)	98	
	Sto-0_6-rtH12	Marine sponges, McMurdo Sound, Ross Sea, Antarctica HMMVPog-31 (AJ579314)	99	
MCG	Sto-6_8-rtC05	Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea ED1-40 EU332079)	98	
	Sto-6_8-rtC06	Marine sediments, East Sea, Korea ED1-40 (EU332079)	99	
	Sto-6_8-rtE04	Marine sediments, East Sea, Korea ED1-40 (EU332079)	98	
Novel	Sto-6_8-rtD05	Marine sediments, East Sea, Korea 1a_A4 (AY800198) Organic poor sediments, central Pacific Ocean	99	
<i>Euryarchaeota</i> RC-V	Sto-0_6-rtA02	a87R41 (DQ417474)	89	
	Sto-0_6-rtA03	Basaltic flanks, East Pacific Rise LDS8 (AY133926)	88	
	Sto-0_6-rtA04	Eutrophic Lake Dagow sediment mrR2.59 (DQ310459)	90	
	Sto-0_6-rtA05	Arctic river and coastal Arctic Ocean c2LKS7 (AM085549)	89	
	Sto-0_6-rtA06	Lake Kinneret sediment iBSZ2p.21 (DQ146762)	94	
	Sto-0_6-rtA10	Arctic river and coastal Arctic Ocean iBSZ2p.92 (DQ146755)	92	
	Sto-0_6-rtA12	Arctic river and coastal Arctic Ocean a87R41 (DQ417474)	89	
	Sto-0_6-rtB01	Basaltic flanks, East Pacific Rise met36 (DQ082940)	85	
	Sto-0_6-rtB02	13°N hydrothermal vent field on the East Pacific Rise a87R46 (DQ417478)	94	
	Sto-0_6-rtB03	Basaltic flanks, East Pacific Rise a87R41 (DQ417474)	88	
	Sto-0_6-rtB05	Basaltic flanks, East Pacific Rise mrR2.52 (DQ310448)	94	
	Sto-0_6-rtB08	Arctic river and coastal Arctic Ocean iBSZ2p.21 (DQ146762)	95	
	Sto-0_6-rtB10	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR1.27 (DQ310387)	92	
	Sto-0_6-rtC02	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR1.57 (DQ310389)	90	
	Sto-0_6-rtD09	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR2.19 (DQ310452)	88	
	Sto-0_6-rtD10	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR2.57 (DQ310460)	86	
	Sto-0_6-rtE05	Arctic river and coastal Arctic Ocean ABS3 (AJ227951)	93	
	Sto-0_6-rtF03	Rice roots and anoxic bulk soil of flooded rice microcosms mrR1.57 (DQ310389)	91	
	Sto-0_6-rtF05	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR2.46 (DQ310453)	89	
	Sto-0_6-rtF09	Arctic river and coastal Arctic Ocean iBSZ2p.92 (DQ146755)	95	
	Sto-0_6-rtF11	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR1.27 (DQ310387)	92	
	Sto-0_6-rtG01	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR2.59 (DQ310459)	88	
	Sto-0_6-rtG02	Arctic river and coastal Arctic Ocean a87R46 (DQ417478)	89	
	Sto-0_6-rtG03	Basaltic flanks, East Pacific Rise mrR2.59 (DQ310459)	89	
	Sto-0_6-rtG05	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR1.27 (DQ310387)	92	
	Sto-0_6-rtG08	Arctic river and coastal Arctic Ocean LDS7 (AY133925)	90	
	Sto-0_6-rtG09	Eutrophic Lake Dagow sediment oBS65f.29 (DQ146744)	89	
	Sto-0_6-rtG10	Arctic river and coastal Arctic Ocean iBSZ2p.21 (DQ146762)	88	
	Sto-0_6-rtG11	Arctic river and coastal Arctic Ocean oBS65f.29 (DQ146744)	89	
			Arctic river and coastal Arctic Ocean	

	Sto-0_6-rtG12	mrR1.27 (DQ310387)	91
	Sto-0_6-rtH01	Arctic river and coastal Arctic Ocean a87R1 (DQ417464)	88
	Sto-0_6-rtH03	Basaltic flanks, East Pacific Rise LDS17 (AY133904)	89
	Sto-0_6-rtH07	Eutrophic Lake Dagow sediment iBSZ2p.92 (DQ146755)	97
	Sto-0_6-rtH09	Arctic river and coastal Arctic Ocean a87R50 (DQ417477)	86
	Sto-0_6-rtH11	Basaltic flanks, East Pacific Rise mrR2.61 (DQ310450)	86
	Sto-6_8-rtA04	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR2.46 (DQ310453)	88
	Sto-6_8-rtA05	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR2.57 (DQ310460)	87
	Sto-6_8-rtB01	Arctic river and coastal Arctic Ocean Dg2003_D_63 (AY531716)	88
	Sto-6_8-rtC02	Profundal sediment, Lake Dagow Dg2003_D_63 (AY531716)	89
	Sto-6_8-rtC12	Profundal sediment, Lake Dagow mrR2.61 (DQ310450)	87
	Sto-6_8-rtD06	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR1.57 (DQ310389)	90
	Sto-6_8-rtD07	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR2.46 (DQ310453)	87
	Sto-6_8-rtD10	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR1.32 (DQ310381)	90
	Sto-6_8-rtD11	Arctic river and coastal Arctic Ocean mrR1.27 (DQ310387)	92
	Sto-6_8-rtD12	Arctic river and coastal Arctic Ocean iBSZ2p.21 (DQ146762)	94
	Sto-6_8-rtE02	Arctic river and coastal Arctic Ocean a87R28 (DQ417468)	87
	Sto-6_8-rtE03	Basaltic flanks, East Pacific Rise mrR2.19 (DQ310452)	88
	Sto-6_8-rtF01	Arctic river and coastal Arctic Ocean a87R41 (DQ417474)	87
	Sto-6_8-rtF03	Basaltic flanks, East Pacific Rise 11-PML 8% (AF477922)	94
	Sto-6_8-rtF04	Shallow ponds, coastal solar saltern, Spain a87R28 (DQ417468)	89
	Sto-6_8-rtF06	Basaltic flanks, East Pacific Rise metA11 (DQ082931)	85
	Sto-6_8-rtG01	13°N hydrothermal vent field on the East Pacific Rise a87R41 (DQ417474)	88
	Sto-6_8-rtG03	Basaltic flanks, East Pacific Rise ABS12 (AJ227955)	91
	Sto-6_8-rtG06	Rice roots and anoxic bulk soil of flooded rice microcosms a87R46 (DQ417478)	88
	Sto-6_8-rtG12	Basaltic flanks, East Pacific Rise metF11 (DQ082972)	89
	Sto-6_8-rtH12	13°N hydrothermal vent field on the East Pacific Rise c2LKS7 (AM085549)	91
TMEG	Sto-0_6-rtC09	Lake Kinneret sediment EJ1-63 (EF591414)	88
	Sto-0_6-rtE01	Marine sediments, East Sea, Korea EJ1-12 (EF591463)	98
	Sto-0_6-rtH10	Marine sediments, East Sea, Korea EJ1-12 (EF591463)	98
	Sto-6_8-rtC04	Marine sediments, East Sea, Korea EJ1-12 (EF591463)	98
	Sto-6_8-rtD02	Marine sediments, East Sea, Korea EJ1-63 (EF591414)	90
	Sto-6_8-rtF02	Marine sediments, East Sea, Korea EJ1-63 (EF591414)	87
SM1	Sto-0_6-rtC10	Marine sediments, East Sea, Korea DALK13 (AJ631252)	88
	Sto-0_6-rtE03	Archaeal strings-of-pearls communities, cold sulfidic springs DALK13 (AJ631252)	89
	Sto-6_8-rtE06	Archaeal strings-of-pearls communities, cold sulfidic springs PILK13 (AJ631256)	90
DHVE-4	Sto-0_6-rtC03	Archaeal strings-of-pearls communities, cold sulfidic springs a87R36 (DQ417476)	86

	Sto-0_6-rtD01	Basaltic flanks of the East Pacific Rise JTA69 (AB015280)	77
	Sto-6_8-rtD03	Deep cold seep sediment, Japan Trench a87R36 (DQ417476)	92
DHVE-6	Sto-0_6-rtD03	Basaltic flanks, East Pacific Rise metF7 (DQ082932)	93
MBG-E	Sto-0_6-rtC08	13°N hydrothermal vent field on the East Pacific Rise pIR3AG06 (AY354120)	94
MBG-D	Sto-6_8-rtF05	Carbonate-rich metalliferous sediments, Rainbow vent field, Mid-Atlantic Ridge ED1-23 (EU332095)	99
LDS	Sto-6_8-rtB08	Marine sediments, East Sea, Korea mrR1.24 (DQ310398)	94
VAL III	Sto-6_8-rtC03	Arctic river and coastal Arctic Ocean Val84 (AJ131270)	92
Group VI	Sto-6_8-rtA03	<i>Archaea</i> in bacterioplankton of boreal Valkea Kotinen forest lake VIDL-2 (AY380659)	95
		Surface microlayer of corals, Florida Keys	

SM2. Closest relatives of representative clones from RNA-derived archaeal 16S rRNA gene libraries from depths 0 to 6 cmbsf (Sto-0_6-rt) and 6 to 8 cmbsf (Sto-6_8-rt).

CHAPITRE 5

**Etude préliminaire de la diversité des communautés
Archaea dans des sédiments associés aux zones de
pockmarks du delta profond du Nil**

I - INTRODUCTION

Le delta profond du Nil en Méditerranée se caractérise, entre autres, par la présence, en fond de mer, de nombreuses émissions de fluides, repérables le long de la pente continentale entre 600 et 3000 mètres de profondeur. En fond de mer ces sorties de fluides présentent des signatures géophysiques et morphologiques, facilitant leur repérage, tels que: (i) constructions sédimentaires en cônes très aplatis, ou volcans de boue, (ii) édifices circulaires, très plats, en galette ou cheminées à gaz, ou (c) taches de réflectivité, ou pockmarks qui sont des dépressions superficielles sur le plancher océanique. Sous l'effet de la température, de la pression et des contraintes tectoniques importantes, l'épaisse couche de sédiments (âgée de plus de 150 millions d'années) de la marge continentale égyptienne se déforme et libère peu à peu des fluides (eau, gaz, hydrocarbures et saumures). Pendant l'ère Miocène, la mer Méditerranée a été isolée de l'océan Atlantique, provoquant des évaporations massives et le dépôt d'évaporites dans les bassins plus profonds. La crise saline du Messinien a été un événement majeur dans l'évolution des bassins Méditerranéens, surtout dans la région de la marge Egyptienne. Après la crise du Messinien, et les dépôts successifs de sédiments épais, les activités tectoniques sont devenues très actives en Egypte (Dupré *et al.*, 2007). Dans les provinces ouest et est du delta du Nil, le plancher sous-marin est caractérisé par de nombreuses structures liées au tectonisme salé, telles que failles et diapirs de sel. Cette région est aussi riche en hydrocarbures, et les migrations de fluides au travers des failles tectoniques sont très intense dans cette région (Dupré *et al.*, 2007).

Les pockmarks sont des preuves de zones potentielles d'émissions de fluides froids (Loncke *et al.*, 2004). Ils sont très abondants dans les provinces centrales et ouest du delta du Nil. Dans la zone centrale, les champs étendus de pockmarks coïncident avec une zone majeure de déstabilisation du sédiment. Les dépôts sédimentaires déstabilisés et les pockmarks semblent être étroitement liés. La présence de couches d'hydrates de gaz est souvent associée sur les profils sismiques à un réflecteur, appelé "Bottom-Stimulating Reflector" (BSR), indicateur de la présence d'hydrates de gaz dans les sédiments océaniques, bien que son absence ne signifie pas qu'il n'y a pas d'hydrates. Dans la zone du delta du Nil, des BSR ont été observés, même si la présence d'hydrates de gaz n'a pas encore été démontré par carottage. Les pockmarks situés dans différentes zones du delta du Nil

sont des sites actifs associés à des émissions de méthane et à des croûtes de carbonates authigéniques, dont la principale source de carbone est dérivée de l'activité microbienne d'oxydation anaérobie du méthane contenue dans les fluides ascendant (Gontharet *et al.*, 2007).

Dans le but de caractériser les communautés *Archaea* dans des sédiments associés à des pockmarks, dans le delta profond du Nil, nous avons analysé la diversité des gènes codant l'ARNr 16S spécifique des *Archaea* à l'aide de la technique de PCR-DGGE. Les bandes d'intérêt ont été excisées et séquencées afin d'identifier de façon préliminaire les principaux acteurs *Archaea* dans ces sédiments.

Lors de la campagne MEDECO, nous avons visité différentes régions du delta du Nil, dont deux zones appelées 2A et 2B (riche en croûtes carbonatées) de la région centrale, comprenant des vastes champs de pockmarks (Figure 24).

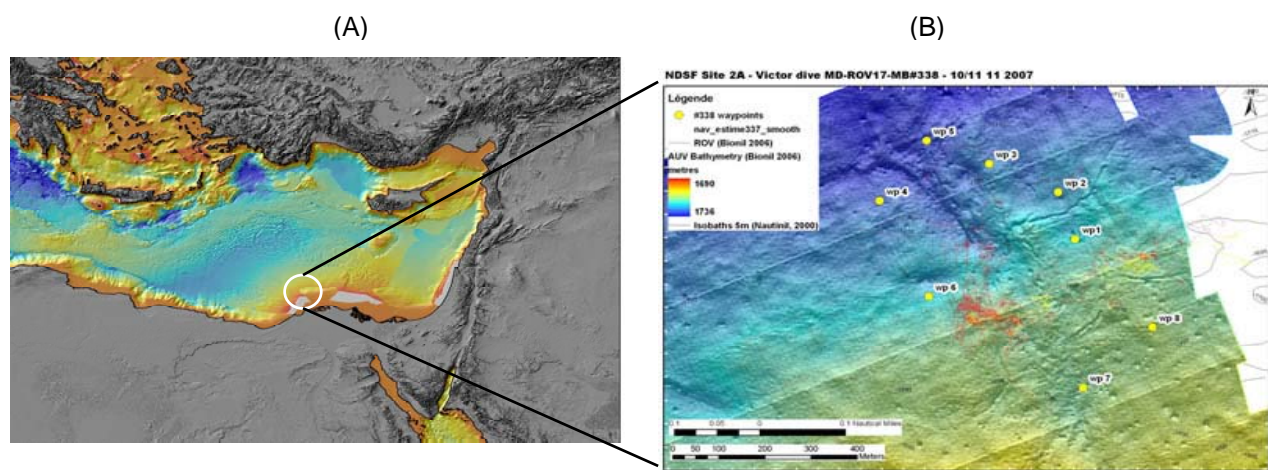


Figure 24: (A) Carte bathymétrique de la mer Méditerranée orientale situant les deux zones de pockmarks du delta du Nil central, et (B) Carte bathymétrique d'un agrandissement de la région 2A de pockmarks (Géosciences Azur).

Au cours des plongées 337-16 et 336-15, deux carottiers tubes opérés par le robot Victor 6000 et nommés PC-3 (32°32.0013 N, 30°21.1258 E, 1693 m profondeur) et PC-5 (32°30.0121 N, 30°15.6530 E 1686 m profondeur), ont été récoltés dans les régions 2A et 2B respectivement (photos de l'échantillonnage dans l'Annexe I). Le PC-3 contenait des bulles de gaz (Figure 25), et montrait à sa surface des granules de couleur gris-blancs. Les carottes de sédiments ont été sectionnées par tranches de 2 cm pour des analyses géochimiques et moléculaires.



Figure 25: Photos des échantillons PC3 révélant de bulles de gaz caractéristiques de la saturation en méthane dans l'eau interstitielle des sédiments et PC5 prélevés dans la zone de pockmarks du delta du Nil.

II – RESULTATS et DISCUSSION

II-1 – Les profils de concentrations en sulfates dans les eaux interstitielles des sédiments de pockmarks du delta du Nil

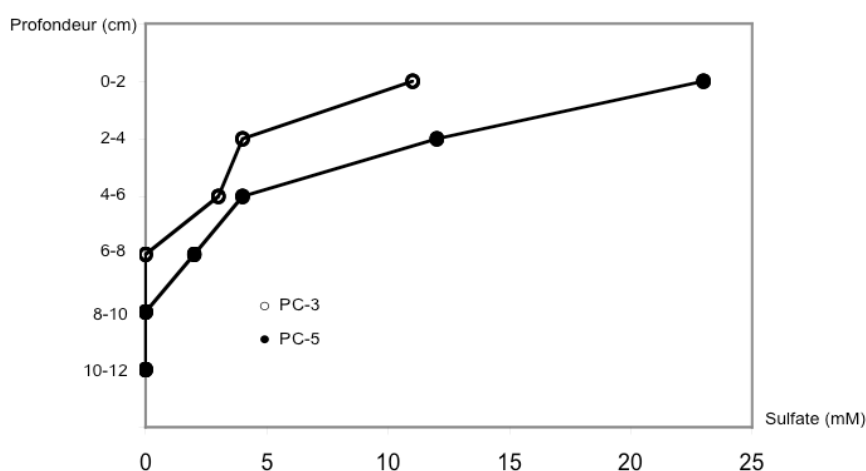


Figure 26: Profils de concentrations en sulfate dans l'eau interstitielle des sédiments des carottes PC-3 et PC-5 de la zone des pockmarks du delta du Nil.

Les concentrations en sulfates dissous dans les eaux interstitielles diminuent de manière constante jusqu'à l'épuisement, à 8 et 10 cm sous le plancher océanique pour PC-3 et PC-5 respectivement (Figure 26). La profondeur à partir de laquelle le sulfate disparaît totalement permet de situer la zone de transition méthane-sulfate potentiellement caractéristique d'une forte activité d'AOM (Iversen et Jorgensen, 1985). Les deux profils des concentrations en sulfates pour les échantillons PC-3 et

PC-5 montrent une consommation rapide dans les 8 à 10 premiers centimètres du sédiment. Nous n'avons pas observé de faune ou de tapis bactériens visibles à la surface de ces sédiments, à l'exception de dépôts gris blancs dont l'observation au microscope n'a pas montré une morphologie caractéristique de bactéries filamenteuses. Dans ce cas, le sulfate dans les sédiments provient de la diffusion à partir de la colonne d'eau. L'absence de faune ou de tapis qui augmentent généralement le réservoir de sulfate dans l'eau interstitielle, peut expliquer l'épuisement rapide de sulfate dans les couches sédimentaires superficielles.

Les concentrations en sulfate dans les eaux interstitielles varient entre les échantillons PC-3 et PC-5. En effet les concentrations en sulfate au niveau de l'interface sédiment-eau de mer sont proches de 10 mM pour PC-3 alors qu'elles montrent des concentrations proches des concentrations typiques de la colonne d'eau (environ 25 mM) pour PC-5.

Cette différence de concentrations reflète vraisemblablement une dilution des eaux interstitielles avec des fluides appauvris en sulfate provenant d'un réservoir plus profond, ou bien la présence d'hydrates de gaz pour PC-3. En effet, l'observation visuelle de la carotte PC-3 révèle une saturation en gaz (Figure 25) qui résulte probablement d'une migration intense de fluides au travers de la couche sédimentaire dans le site 2A. Ce résultat suggère également que les mouvements de fluides, donc l'activité du site à pockmarks 2A est plus importante que pour le site 2B. Cette hypothèse se confirme également par la détermination de la profondeur de pénétration du sulfate dans les couches sous-jacentes. En effet, le sulfate pénètre moins profondément dans les sédiments de la carotte PC-3 (6-8 cm, site 2A), que dans les sédiments de la carotte PC-5 (8-10 cm, site 2B) probablement en raison de forts flux de fluides ascendants riches en méthane et appauvris en sulfate, issus d'une source plus profonde.

II-2 – La distribution verticale des communautés *Archaea*

La diversité des communautés *Archaea* a été étudiée à l'aide de la technique moléculaire de PCR-DGGE basée sur l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S spécifique du domaine des *Archaea* (Figure 27).

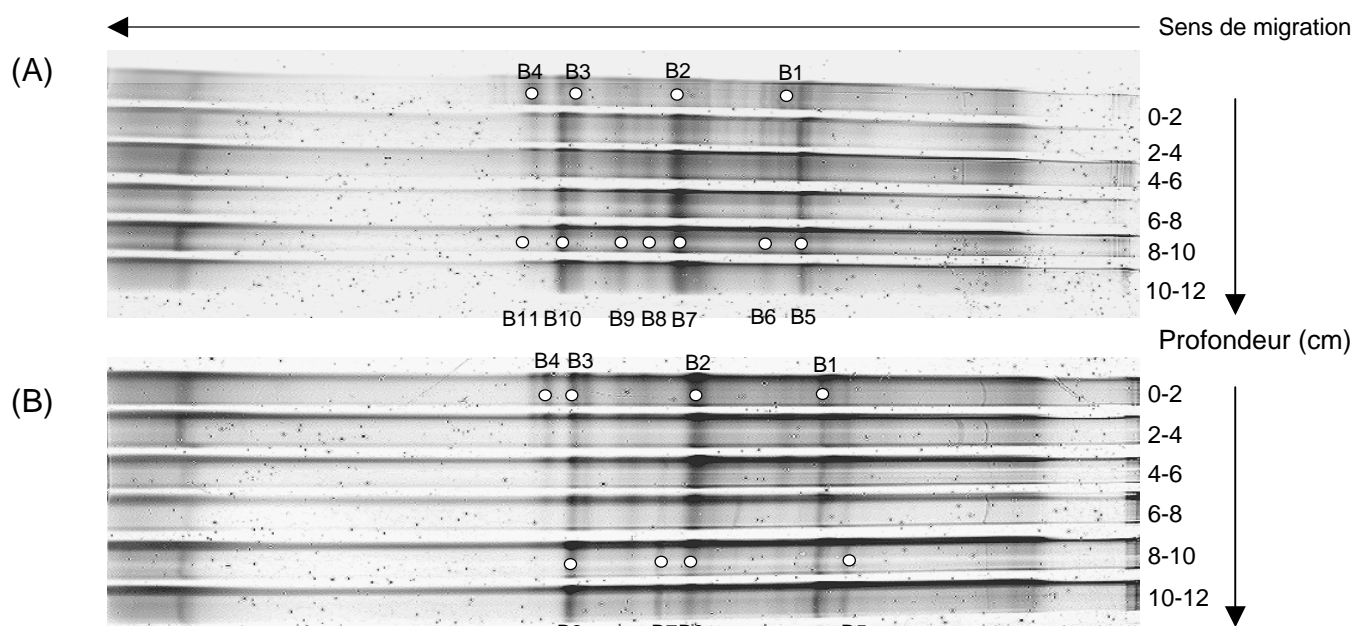


Figure 27: Profils DGGE, selon un gradient dénaturant de 30% à 60%, des produits d'amplification des gènes codant l'ARNr 16S *Archaea* obtenus à partir de matrices ADN extraites des sédiments des carottes PC-3 (A) et PC-5 (B) de la zone de pockmarks du delta du Nil. Les numéros indiqués B1 à B11 pour PC-3 correspondent aux séquences PC3-dggeB1 à PC3-dggeB11, et les numéros indiqués B1 à B8 pour PC-5 correspondent aux séquences PC5-dggeB1 à PC5-dggeB11.

L'analyse des séquences partielles (environ 150 pb) des sédiments collectés sur la zone des pockmarks 2A et 2B du delta profond du Nil révèle que la majorité des phylotypes détectés dans les profils DGGE sont affiliés à des groupes d'*Archaea* méthanotrophes anaérobies (ANME) probablement impliqués dans le processus d'oxydation anaérobie du méthane (Tableaux 4 et 5).

Affiliation phylogénétique	Bande DGGE	Clone le plus proche dans les banques (numéro d'accèsion) et origine des échantillons	% de similarité
<i>Euryarchaeota</i> MBG-D	PC3-dggeB1	113A67 (EF687634) Microbial mat, Chefren mud volcano	100
	PC3-dggeB5	SMI1-GC205-Arc25 (DQ521770) Hypersaline sediment, Gulf of Mexico	100
ANME-2c	PC3-dggeB2	Tommo05_1274_3-Arch40 (FM179816) Methane seep, Northern North Sea	100
	PC3-dggeB3	HR-CF-015 (DQ058815) Shallow marine sediment, Hydrate Ridge	93
	PC3-dggeB4	Tommo05_1274_3-Arch40 (FM179816) Methane seep, Northern North Sea	94
	PC3-dggeB6	Tommo05_1274_3-Arch40 (FM179816) Methane seep, Northern North Sea	97
	PC3-dggeB7	Tommo05_1274_3-Arch40 (FM179816) Methane seep, Northern North Sea	99
	PC3-dggeB8	GoM GC185 517R (AY211687) Gas hydrate mounds, Gulf of Mexico	97
	PC3-dggeB9	C1_R048 (AF419644) Methane-rich vents, Guyamas Basin	95
	PC3-dggeB10	HR-CF-012 (DQ058812) Shallow marine sediment, Hydrate Ridge	97
	PC3-dggeB11	Tommo05_1274_3-Arch40 (FM179816) Methane seep, Northern North Sea	100

Tableau 4: Identification des gènes codant l'ARNr 16S correspondant aux bandes DGGE du PC-3, à l'aide du programme BLASTN (NCBI).

Affiliation phylogénétique	Bande DGGE	Clone le plus proche dans les banques (numéro d'accession) et origine des échantillons	% de similarité
<i>Euryarchaeota</i> <i>Thermoplasmatales</i>	PC5-dggeB5	ET5_1F6 (EU585966) Hypersaline microbial mat, Baja	100
ANME-1	PC5-dggeB1	Tommo05_1274-Arch12 (FM179891) Methane seep, Northern North Sea	100
ANME-2a/b	PC5-dggeB4	Amsterdam-MN13BT4-181 (AY593287) Carbonate crust, Mediterranean Sea	98
	PC5-dggeB8	HR-CF-012 (DQ058812) Shallow marine sediment, Hydrate Ridge	98
ANME-2c	PC5-dggeB2	Tommo05_1274-Arch40 (FM179816) Methane seep, Northern North Sea	98
	PC5-dggeB6	Tommo05_1274-Arch40 (FM179816) Methane seep, Northern North Sea	97
	PC5-dggeB7	Tommo05_1274-Arch40 (FM179816) Methane seep, Northern North Sea	100
Methanogène	PC5-dggeB3	SC3 (DQ160191) High-rate anaerobic bioreactor	100

Tableau 4: Identification des gènes codant l'ARNr 16S correspondant aux bandes DGGE du PC-5, à l'aide du programme BLASTN (NCBI).

Le suivi moléculaire par la technique de DGGE des sédiments du site de pockmarks 2A du delta profond du Nil (PC-3) montre que les bandes dominantes sont communes pour toutes les couches analysées. Nous n'avons pas observé de changement significatif dans la structure et la composition des communautés *Archaea* en fonction de la profondeur d'enfouissement, et des concentrations en sulfate dans les eaux interstitielles. Les séquences des gènes codant l'ARNr 16S sont affiliées en majorité au clade des ANME-2c dont les représentants seraient probablement impliqués dans l'oxydation anaérobie du méthane. Ce résultat suggère que des communautés d'ANME sont omniprésentes dans les sédiments associés au pockmark du site 2A, que ce soit dans des sédiments riches en sulfate, dans la zone de transition méthane-sulfate ou dans des sédiments pauvres en sulfate. La présence d'ANME dans ces trois zones distinctes du sédiment reste toutefois énigmatique.

Les séquences des bandes PC3-dggeB1 et B5 (Figure 27) sont affiliées au groupe d'*Archaea* incultivés Marine Benthic Group D (MBG-D), avec 100 % de similarité. La bande B5 est commune à toutes les couches de sédiment analysées suggérant leur présence ubiquiste dans les sédiments de la carotte PC-3. L'activité et le rôle des représentants du MBG-D sont pour le moment inconnus.

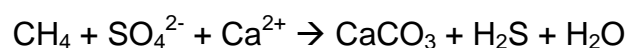
Les sédiments du site à pockmark 2B sont caractérisés par la présence de croûtes carbonatées. L'analyse moléculaire par la technique de DGGE des sédiments de la carotte PC-5 montre aussi une homogénéité dans la composition et

la distribution des communautés *Archaea* en fonction de la profondeur d'enfouissement. Le nombre de bandes visibles sur le profil électrophorétique reflète une faible diversité. La majorité des séquences analysées sont affiliées aux clades d'*Archaea* méthanotrophes anaérobies des ANME-1, ANME-2a/b, et ANME-2c, et sont probablement impliquées dans l'oxydation anaérobie du méthane. De même que pour la carotte prélevée dans le site 2A (PC-3), les sédiments du site 2B (PC-5) montrent la présence de communautés *Archaea* méthanotrophes dans des sédiments riches en sulfate.

De façon plus précise, la séquence correspondant à la bande PC5-dggeB3 extraite du gel DGGE est affiliée avec une *Archaea* méthanogène appartenant à l'ordre des *Methanosarcinales*. Les représentants cultivés des méthanogènes appartenant aux *Methanosarcinales* utilisent des substrats cataboliques variés pour synthétiser le méthane (H_2/CO_2 , acétate, et composés méthylés...). Les sédiments riches en sulfate abritent généralement des bactéries sulfato-réductrices dont les substrats carbonés mais également les sources d'énergie (hydrogène) sont communes avec les méthanogènes (ex: acétate, CO_2 ...). Par contre les composés méthylés (méthylamine par exemple) sont des substrats carbonés dits non compétitifs. Il n'est donc pas surprenant de détecter dans les couches de sédiments superficielles riches en sulfate des méthanogènes probablement méthylotrophes, puisqu'elles sont capables de consommer des composés méthylés pour fabriquer du méthane qui ne sont pas assimilés par les BSR.

D'autre part, une séquence obtenue à partir de la bande PC5-dggeB5 est affiliée à l'ordre des *Thermoplasmatales*, avec 100 % de similarité. Tous les représentants cultivés appartenant à l'ordre des *Thermoplasmatales* sont acidophiles c'est-à-dire ont un optimum de croissance en dessous d'un pH de 2.0. Cette bande a été extraite de la piste correspondant à la section 10-12 cm de profondeur pour la carotte PC-5. Cette section de sédiment comprend également des séquences affiliées au clade des ANME-2. La présence simultanée de représentants des *Thermoplasmatales* et des ANME-2 a déjà été observée dans des sédiments du Kuroshima Knoll (Japon) associés à des migrations intenses de fluides riches en CO_2 (Inagaki *et al.*, 2004), dans la colonne d'eau de la Mer Noire (Vetriani *et al.*, 2003), et dans des bioréacteurs à flux continu de sédiments provenant du Monterey Canyon (Girguis *et al.*, 2003).

La présence de membres des *Thermoplasmatales* dans des sédiments des pockmarks du delta profond du Nil suggère que les microorganismes appartenant aux *Thermoplasmatales* préféreraient des environnements anoxiques riches en matière organique et comprendraient des représentants non acidophiles ou tolérants de pH plus proches de la neutralité ou basique (Inagaki *et al.*, 2004). L'observation de signatures moléculaires d'ANME reflète la présence de populations *Archaea* probablement impliquées dans le processus d'oxydation anaérobie du méthane. Or le processus d'AOM implique une augmentation significative du carbone inorganique et de l'alcalinité. Dans ces conditions les ions calcium peuvent précipiter pour former des carbonates de calcium selon l'équation suivante (Knittel et Boetius, 2009):



C'est pourquoi, les habitats colonisés par des ANME sont caractérisés par des dépôts massifs de croûtes carbonatées et une augmentation locale de l'alcalinité et du pH. La présence simultanée de *Thermoplasmatales* acidophiles et d'ANME semble donc contradictoire. Les paramètres environnementaux comprenant principalement la température et le pH ne permettent pas d'expliquer la présence de microorganismes acidophiles dans des sédiments associés à des pockmarks du delta profond du Nil. Cependant, en raison des limites liées aux outils moléculaires, dont la petite taille des fragments PCR séquencés (environ 150 pb), il est possible que la séquence PC5-dggeB5 appartienne à une nouvelle lignée d'*Archaea* appartenant aux *Thermoplasmatales*, adaptée à des températures basses et des pH autour de la neutralité. De plus, la famille des *Picrophilaceae*, qui appartient aux *Thermoplasmatales*, comprend des représentants cultivés qui ont une croissance préférentielle à un pH de 7 (Boone et Castenholz, 2001).

III – CONCLUSION

Lors de cette étude, les résultats préliminaires obtenus avec la technique moléculaire de PCR-DGGE confirment l'importance écologique des communautés *Archaea* impliquées dans l'oxydation anaérobie du méthane dans des sédiments de pockmarks riches en méthane. En effet, des séquences affiliées à des *Archaea*

méthanotrophes ANME ont été détectées dans les deux carottes de sédiments des pockmarks du delta central du Nil.

D'autre part, les pockmarks de la zone 2B comportent des croûtes carbonatées qui peuvent faire office de "bouchons" et piéger le méthane dissout dans les fluides ascendants, et ainsi augmenter la disponibilité en méthane dans les sédiments superficiels. C'est pourquoi, les écosystèmes soumis à des émissions de fluides froids tels que les sédiments de pockmarks pourraient être des niches écologiques privilégiées pour le développement de communautés *Archeaea* méthanotrophes diversifiées au même titre que les sédiments associés aux volcans de boue sous-marin.

SUMMARY

INTRODUCTION

Fluid flows throughout the seabed occur at the continental margin in The Nile Deep Sea Fan (NDSF), Eastern Mediterranean Sea, at 600 to 3000 meters of water depth (Dupré *et al.*, 2007). Extensive pockmark fields, which are potential indicators of cold seeps, are abundant in the central part of the NDSF (Loncke *et al.*, 2004). These Nile Deep Sea Fan pockmarks are very active sites, and are associated with methane seepage and authigenic carbonate crusts, whose main carbon source is probably derived from anaerobic oxidation of methane composing ascending fluid flows (Gontharet *et al.*, 2007).

In this preliminary study, we sought to characterize archaeal communities in sediments associated with pockmarks of the NDSF. Thus, PCR-DGGE based on archaeal specific 16S rRNA genes was carried out. Dominant bands were excised and sequenced, in order to identify the dominant archaeal members present in this ecosystem.

During the MEDECO cruise, we sampled two extensive pockmark areas of the central NDSF (Fig. 24), called 2A and 2B (which contained carbonate crusts). One push core PC-3 (1693 m water depth) was recovered from the 2A area, and upon recovery contained many gas bubbles (Fig. 25). A second push core PC-5 (1689 m water depth) was recovered from the 2B area. Both sediment samples were recovered by grey-white particles, which did not seem to be filamentous bacteria based on microscopic observations.

RESULTS and DISCUSSION

Pore water sulfate concentrations in sediments of both push cores decreased until depletion at 8 and 10 cmbsf for PC-3 and PC-5 respectively (Fig. 26). Hence the sulfate to methane transition zone was probably situated in the top ten centimeters for both sediment cores. Both pore water profiles showed a rapid sulfate consumption. As no fauna, nor bacterial mats were observed on the surface of the sediment cores, sulfate in pore water only diffused from the sea water column, which could explain the sulfate depletion in the shallow sediment layers of the NDSF pockmarks.

Sulfate concentrations were low in the sediment-water interface for the PC-3 core (10 mM), whereas in the same layers sulfate concentrations were close to sulfate concentrations measured in the water column for PC-5 (25 mM). The low pore water sulfate concentrations in PC-3 sediments could be explained by mixing with ascending sulfate-depleted fluids, or presence of gas hydrates. Furthermore, visual observations of PC-3 core upon recovery showed intense gas bubbling, probably indicating intense fluid migrations in sediments of the 2A pockmark area. Hence, these results suggest that activity was higher in pockmark site 2A than in site 2B.

Archaeal community diversity was assessed using PCR-DGGE based on the 16S rRNA genes (Fig. 27). Analysis of the partial sequences (around 150 bp) detected from sediments of the two NDSF pockmarks areas revealed that ANME affiliated sequences dominated (Tables 4 and 5).

PCR-DGGE fingerprinting pattern for the PC-3 core suggested that no significant shift in the archaeal structure occurred with depth. And, as few bands were visible on the DGGE gel, it seems that archaeal diversity was limited. Sequences were mainly affiliated with ANME-2c, probably mediating AOM. Hence, intriguingly, ANME members were omnipresent, whether in sulfate-rich, sulfate-depleted, or sulfate to methane transition zones.

PCR-DGGE fingerprinting pattern for the PC-5 core also suggested that no significant shift in the archaeal structure took place with depth, and that archaeal diversity was limited. Sequences were mostly affiliated with ANME-1, 2a/b, and 2c, probably carrying out AOM. The same observation appertaining to omnipresence of these sequences as for the PC-3 core can be made.

One DGGE band sequence PC5-dggeB3 was affiliated with a cultivated methanogen belonging to the *Methanosarcinales*. As members of this order comprise methylotrophic methanogens that are able to use non competitive substrates, it is not surprising to find *Methanosarcinales* in these sediment layers (0-2 cmbsf) where SR seems to occur.

Also, DGGE band sequence PC5-dggeB5 was affiliated with the *Thermoplasmatales*. Simultaneous presence of ANME-2 and *Thermoplasmatales* has been previously observed (Vetriani *et al.*, 2003; Girguis *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2004). However, known cultivated strains belonging to the *Thermoplasmatales* are thermophilic acidophiles. And, AOM processes tend to increase alkalinity by

producing inorganic carbon, that precipitate and form carbonate crusts, which were observed in the 2B area. Hence, as the PC5-dggeB5 sequence was short, it is possible that it belonged to a new lineage of *Thermoplasmatales*, whose members could be adapted to cold temperatures, and to pH close to 7.

CONCLUSION

This preliminary molecular study of archaeal communities in the NDSF confirms the ecological importance of anaerobic methanotrophic *Archaea* in methane-rich sediments in pockmark structures. Also, the carbonate crusts found in the 2B area could trap ascending methane and thus locally increase methane availability. Therefore, intense fluid flows, and high dissolved methane concentrations in these pockmark sediments could provide adapted ecological niches for diverse anaerobic methanotrophic *Archaea*, as is observed in sediments associated with other marine structures such as mud volcanoes.

DISCUSSION GENERALE

La majorité du méthane sur terre est produit par le processus microbien de méthanogenèse, étape finale de la fermentation de la matière organique, dans les intestins d'animaux, les rizières, les sols, les massifs d'enfouissement des déchets ainsi que dans les sédiments d'eau douce et marins. Les estimations récentes proposent qu'environ 10 à 20% du matériel organique biodégradable et enfoui dans les sols et les sédiments est converti en méthane. Pour les océans, qui couvrent 71% de la surface de la terre, le taux annuel de méthanogenèse est de 85 à 300 Teragrammes (10^{12}) de méthane par an. Selon les mêmes estimations plus de 90% de ce méthane est consommé par le processus microbien d'oxydation anaérobie du méthane (Knittel et Boetius, 2009), ce qui représente 7 à 25% de la production globale de méthane. Ainsi, en milieu océanique sédimentaire, l'AOM représente un biofiltre efficace qui contrôle les émissions de méthane vers l'océan (<2% des flux globaux). Le méthane (CH_4), l'hydrocarbure le plus léger, est issu à la fois de la fermentation de la matière organique par l'activité microbienne mais également du craquage thermique dans les couches sédimentaires. Cependant les résultats moléculaires et isotopiques montrent que l'essentiel du méthane présent à la fois sous forme d'hydrate, dissout ou encore gazeux a une origine biogénique (Kvenvolden, 1995).

Au niveau des marges continentales les zones d'émissions de fluides froids sont le siège de processus biogéochimiques complexes, comprenant entre autres les cycles du méthane et du soufre. Dans ce contexte, les processus microbiens tiennent une place importante puisqu'ils interviennent activement dans le recyclage de certains éléments clefs, tels que l'hydrogène sulfuré, le sulfate, le méthane ou encore le dioxyde de carbone. Il est donc important de mieux comprendre les facteurs environnementaux qui influencent la distribution et l'activité des communautés microbiennes.

Ce travail de recherche doctorale financé par le vaste projet européen HERMES (dont les objectifs principaux étaient d'identifier les acteurs microbiens impliqués dans ces processus biogéochimiques, et les facteurs environnementaux pouvant influencer leur distribution, diversité et activité), a essentiellement porté sur l'étude des communautés microbiennes impliquées dans le cycle du carbone. De manière plus spécifique, nous avons étudié la diversité, la distribution, et l'activité des communautés anaérobies méthanogènes et méthanotrophes. D'autre part, la

distribution des communautés microbiennes en fonction des gradients géochimiques a aussi été appréhendée.

Pour répondre à ces objectifs, la stratégie employée a reposé sur l'utilisation de techniques moléculaires indépendantes des étapes de cultures au laboratoire. Le gène codant pour la petite sous-unité du ribosome ARNr 16S spécifique du domaine des *Archaea*, a été analysé comme marqueur structural de la communauté *Archaea* totale. Des gènes alternatifs métaboliques ont été ciblés pour identifier spécifiquement les communautés méthanogènes/méthanotrophes (*mcrA*; méthyl coenzyme M réductase), et les bactéries sulfato-réductrices (*dsrAB*; sulfate réductase dissimilatrice). Ces gènes fonctionnels, impliqués dans la synthèse d'enzymes clés des voies métaboliques de méthanogenèse, méthanotrophie et de sulfato-réduction ont permis d'établir un lien entre l'identité génétique et la fonction potentielle des microorganismes dans les écosystèmes. Enfin, les ARN ribosomiques, considérés comme des marqueurs de l'activité métabolique, ont servi de matrice pour l'étude des communautés *Archaea* métaboliquement actives. L'ensemble des résultats obtenus pendant cette thèse ont permis de dégager plusieurs hypothèses qui sont discutées dans les paragraphes suivants.

D'autre part nous présentons l'ensemble des signatures moléculaires observées dans les différentes zones étudiées pendant ce travail de thèse (Figure 28). Enfin, nous présentons l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de recherche sous forme de deux arbres phylogénétiques regroupant tous les clones analysés. Le premier décrit la diversité des *Archaea* métaboliquement actives basée sur l'étude du gène codant l'ARNr 16S après rétro-transcription (Figure 29). Le second repose sur l'analyse des gènes *mcrA*, spécifiques des communautés méthanogènes et méthanotrophes anaérobies (Figure 30).

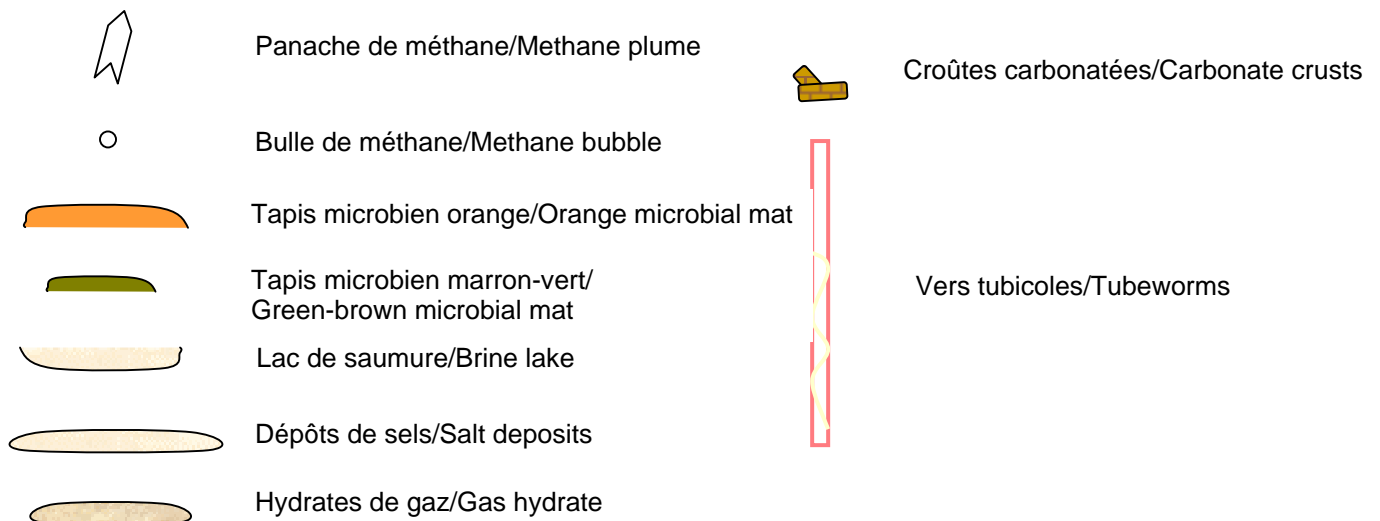
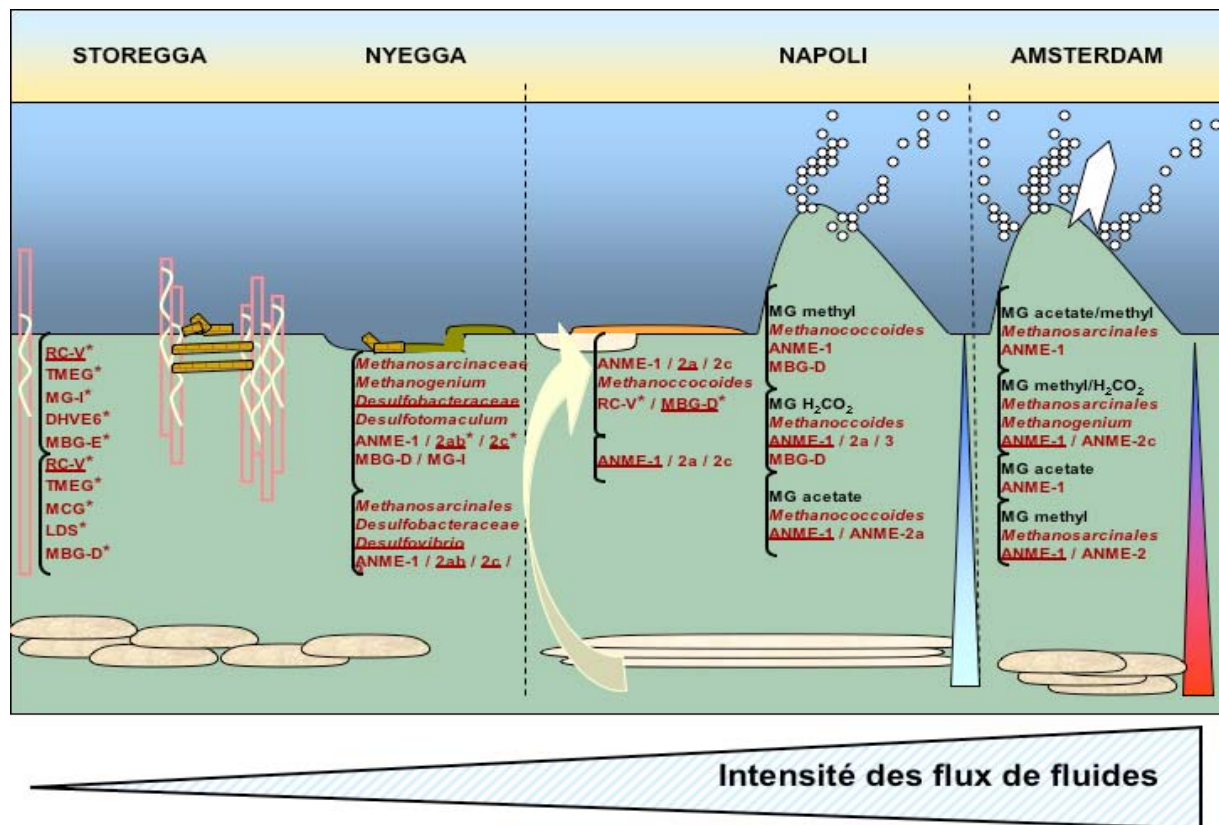


Figure 28: Représentation schématique montrant la diversité et la distribution des communautés microbiennes observées dans les sédiments des centres des volcans de boue Amsterdam et Napoli, du tapis orange de Napoli, et des sédiments du pockmark G11 de Nyegga, et de Storegga. Les groupes dont les noms sont soulignés correspondent aux groupes dominants, et les noms suivis d'un astérisque sont les groupes d'*Archaea* métaboliquement actifs.

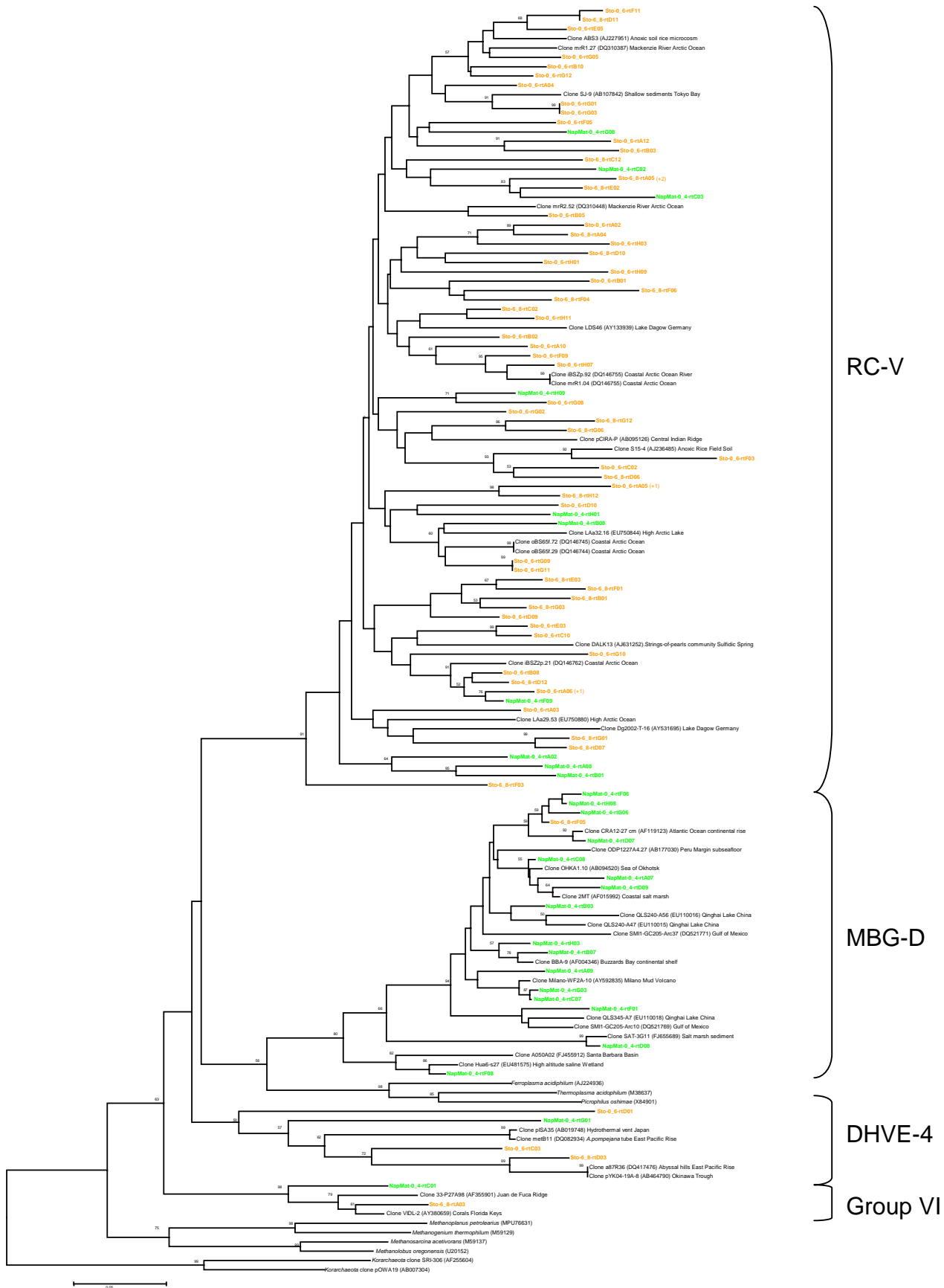


Figure 29: Arbre phylogénétique illustrant les lignées d'*Archaea* incultivées et métaboliquement actives (ARNr 16S) mis en évidence dans les sédiments sous-jacents à des biofilms composés de bactéries filamenteuses de couleur orange du volcan de boue Napoli (NapMat, en vert) et des sédiments de la pente de Storegga (Sto, en orange). L'échelle indique 5 substitutions par position.

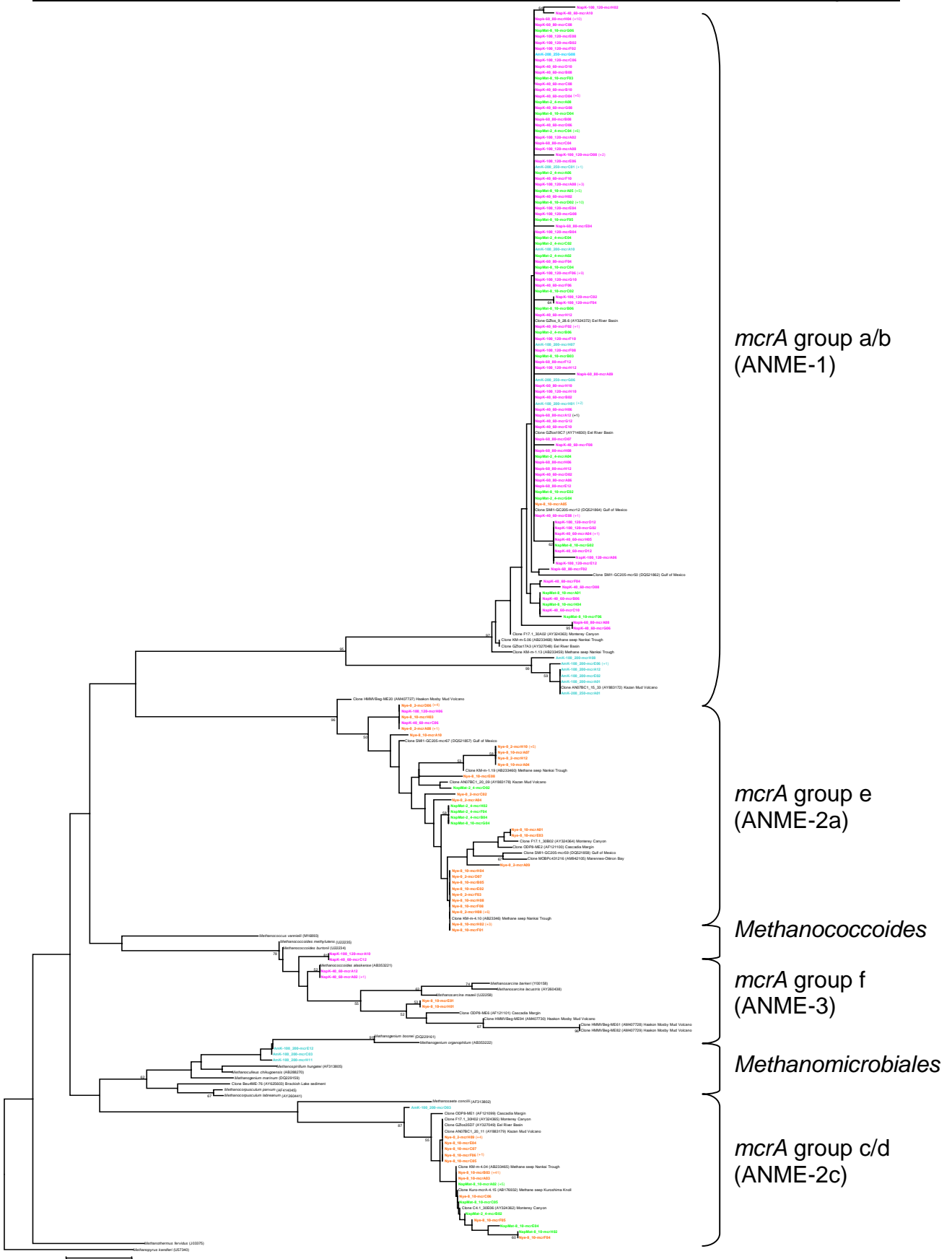


Figure 30: Phylogénie des gènes *mcrA* des principales lignées d'Archaea méthanogènes et méthanotrophes basée sur l'analyse des acides aminés répertoriés dans les sédiments du centre des volcans de boue Napoli (NapK, en rose) et Amsterdam (AmK, en bleu), et associés aux tapis orange de Napoli (NapMat, en vert), ainsi que les sédiments du pockmark Nyegga (Nye, en orange). L'échelle indique 10 substitutions par position.

I - Distribution verticale des communautés microbiennes *Archaea*

La stratégie employée pour étudier la distribution spatiale et plus précisément verticale (selon la profondeur d'enfouissement) des communautés microbiennes *Archaea* repose sur l'utilisation d'une technique d'empreinte génétique de PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). En effet, cette technique s'impose lorsque l'on souhaite comparer rapidement des échantillons et suivre les changements dans la composition des communautés microbiennes. La technique de PCR-DGGE fournit un "profil" de la diversité microbienne par séparation physique des acides nucléiques sur un gel électrophorétique. Ainsi dans notre cas, cette technique est très utile pour comparer le profil de diversité en fonction de la profondeur, avec un profil géochimique ou tout autre paramètre physico-chimique.

Les flux de fluides contrôlent vraisemblablement la distribution des accepteurs d'électrons et influencent en retour la structure verticale des communautés *Archaea* (méthanogènes et méthanotrophes) dans les sédiments marins des marges continentales. Cependant, d'autres facteurs ont probablement un impact sur la composition des communautés *Archaea* tels que les concentrations en sels, la température, la qualité et la quantité de matière organique, ... etc. Ces facteurs environnementaux peuvent alors créer des niches écologiques favorables au développement de certaines communautés microbiennes. Ainsi, les différences que nous avons observées dans la composition des communautés *Archaea* en fonction de la profondeur d'enfouissement dans les sédiments sur les gels de DGGE sont probablement la conséquence de variations dans les profils géochimiques.

Dans le cas des sédiments de la zone de Storegga, peuplés par des vers tubicoles, le profil DGGE a mis en évidence un changement significatif dans la structure de la communauté *Archaea* en fonction de la profondeur de sédiment, probablement en raison de l'activité de bioventilation effectuée par l'animal. En effet, la présence des vers perturbe certainement la répartition des accepteurs d'électrons, et donc la diversité des communautés microbiennes dans le sédiment adjacent aux vers. Ainsi par exemple, il est probable que la couche oxique, qui est habituellement de l'ordre de quelques millimètres, ait été étendue jusqu'à une dizaine de centimètres sous le plancher sous-marin, expliquant ainsi le changement dans la composition des

communautés *Archaea*. De plus, aucune signature d'*Archaea* anaérobies méthanotrophes ou de méthanogènes n'a été détectée, probablement parce que la longueur de la carotte échantillonnée n'a pas permis d'atteindre la base des tubes. Or le maximum d'AOM est probablement localisé à la base des vers (Niemann *et al.*, 2006; Lösekann *et al.*, 2007).

Toutes zones confondues, les séquences *Archaea* détectées sont dominées par des séquences affiliées à des méthanotrophes anaérobies (ANME), regroupant des microorganismes probablement impliqués dans l'oxydation anaérobie du méthane.

Les résultats obtenus portant sur l'étude de la diversité des ANME dans les sédiments du pockmark G11 de Nyegga, dans les sédiments associés à un tapis microbien orange du volcan de boue Napoli, dans les sédiments des pockmarks du delta du Nil, et même dans les sédiments des centres des volcans de boue Napoli et Amsterdam, montrent que les ANME ne sont pas seulement détectées dans les zones de transition méthane-sulfate (ZTMS), mais aussi dans les sédiments riches ou pauvres en sulfate. Cette observation demeure énigmatique, puisqu'il a été montré que l'AOM est maximale dans la ZTMS, qui représenterait par conséquent l'habitat préférentiel et principal des ANME (Knittel et Boetius, 2009). Une explication possible serait une influence des concentrations en méthane sur la répartition des ANME, cette hypothèse sera discutée dans le paragraphe IV-3.

Plusieurs auteurs ont étudié les impacts de facteurs environnementaux pour expliquer la répartition des différents groupes d'ANME. Ainsi, Knittel *et al.* (2005) suggèrent que les ANME-1 pourraient être plus sensibles à l'oxygène que les ANME-2. Nauhaus *et al.* (2005) proposent que les ANME-2 pourraient être mieux adaptés à des températures froides (4°C) que les ANME-1 (optimum de 16 à 24 °C). Dans notre étude portant à la fois sur les sédiments associés au tapis orange du volcan de boue Napoli, et du pockmark G11 de Nyegga, nous avons observé que les ANME-2 dominant et sont métaboliquement actives dans les sédiments de surface (Figure 28). Or les tapis microbiens (caractérisés par des bactéries filamenteuses aérobies) en surface facilitent la pénétration de l'oxygène dans les sédiments sous-jacents, limitant probablement le développement des communautés ANME-1 au profit des

ANME-2. De plus, les températures de fond de mer pour ces zones sont proches de 4°C. Les températures mesurées *in situ* (environ 4°C) seraient donc également favorables au développement des ANME-2 au détriment des ANME-1.

D'autres paramètres environnementaux comme les concentrations en sels influencent vraisemblablement la structure des communautés *Archaea*. L'arbre phylogénétique basé sur le gène *mcrA* (Figure 30) montre que les séquences affiliées au groupe *mcrA a/b* provenant des sédiments du volcan de boue Napoli (sédiments du centre et sédiments associés au tapis microbien orange) sont regroupés dans un même clade, qui regroupe aussi des clones détectés dans des sédiments hypersalés (concentrations en Cl⁻ de l'ordre de 2200 mM, alors que les concentrations sont de l'ordre de 545 mM dans l'eau de mer) du Golfe du Mexique (Lloyd *et al.*, 2006). Lloyd *et al.* ont détecté uniquement des séquences de gènes codant l'ARNr 16S affiliées aux ANME-1b, et proposent que les membres de ce clades sont adaptés à des environnements hypersalés. De plus, la distribution des ANME selon la profondeur diffère d'un site à l'autre dans nos études. Les fortes concentrations en sels (1256 mM [Cl⁻]) pourraient expliquer la présence de séquences affiliées aux ANME-1 dans les sédiments associé aux tapis microbiens du volcan de boue Napoli (Figure 30).

L'observation des profils DGGE obtenus au cours de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence des variations spatiales de la diversité des communautés *Archaea* à l'échelle d'un habitat sédimentaire.

Il est toutefois utile de préciser que ces différences observées dans la structuration des communautés microbiennes pourraient également s'expliquer par des biais méthodologiques (échantillonnage, PCR, clonage, séquençage). En effet, le fait d'avoir recours à deux PCR successives (PCR nichée) augmente le risque de biais inhérents à la technique de PCR (Suzuki et Giovanonni, 1996). De plus, le nombre et l'intensité des bandes observés sur les profils de gels DGGE ne donnent pas nécessairement une image fidèle du nombre ou de l'abondance des espèces composant la communauté microbienne. Un organisme donné peut effectivement produire plus d'une bande sur le gel DGGE à cause de la présence d'opérons multiples. Et, les séquences des gènes codant l'ARNr 16S ne permettent pas toujours de différencier les différentes espèces. Une bande peut en effet

correspondre à plusieurs espèces (Boon *et al.*, 2002). Ainsi, les profils de gels DGGE doivent plutôt être interprétés comme des reflets des séquences d'ADNr les plus abondants et dominants dans les communautés microbiennes. De plus, l'information génétique contenue dans des courts fragments d'ADN comme ceux obtenus par PCR-DGGE (environ 150 pb) limite fortement l'identification phylogénétique des bandes DGGE. Enfin, les pourcentages de similarité obtenus avec les séquences ne permettent pas une identification précise dans les banques de données (GenBank).

II - Diversité des *Archaea* incultivées métaboliquement actives

II-1 – Présence d'une grande diversité d'*Archaea* incultivées métaboliquement actives

Il est intéressant de noter que les inventaires moléculaires des gènes codant l'ARNr 16S ainsi que les analyses DGGE révèlent des communautés microbiennes *Archaea* diversifiées. Une proportion importante des gènes analysés sont affiliés à des ANME confirmant leur importance dans les écosystème sédimentaire des sources froides. Cependant une fraction importante de la communauté *Archaea* est aussi représentée par des séquences appartenant à des microorganismes jusqu'ici incultivés (RC-V, MBG-D, DHVE, MG-I, TMEG, SM1, MCG), et dont le rôle et la fonction dans les écosystèmes marins demeurent inconnus à ce jour. Ces groupes sont classiquement rencontrés dans un large éventail de milieux allant des écosystèmes marins (lacs, rivières, étangs, sédiments de subsurface, sédiments de zones d'émissions de fluides froids), aux écosystèmes terrestres.

II-2 - Présence du groupe RC-V dans les sédiments marins

La détection de séquences affiliées aux RC-V dans de ce travail de thèse, dans des échantillons de sédiments de deux zones d'émissions de fluides froids de marges continentales (sédiments associés à un tapis microbien orange du volcan de boue Napoli, et sédiments de la zone Storegga) apparaît surprenante. Ce sont à notre connaissance, les premières études qui montrent la présence de RC-V métaboliquement actives dans des sédiments marins. Il semble donc que ce groupe soit extrêmement répandu et ubiquiste. La présence de méthane semble jouer un

rôle dans l'établissement et l'activité du groupe RC-V, confortant l'idée que les représentants du RC-V participeraient au cycle du méthane.

II-3 - Hypothèses concernant l'implication de certains groupes d'incultivés dans les cycles géochimiques du carbone et du soufre

Les données géochimiques des différents environnements dans lesquels ces groupes d'*Archaea* incultivés ont été détectés peuvent permettre d'inférer sur leur rôle physiologique dans les écosystèmes rencontrés. Il se pourrait que certains groupes tels que les MCG (Biddle *et al.*, 2006), les RC-V ou les LDS participent au cycle du méthane, ou alors que les RC-V et LDS soient liés à la décomposition de la matière organique (Galand *et al.*, 2006) puisqu'ils sont principalement trouvés dans des sédiments riches en méthane et en matière organique. D'autres groupes, comme les SM1, DHVE, TMEG, MBG-D ou E pourraient être associés au cycle du soufre. En effet, ils ont principalement été détectés dans des environnements riches en sulfate ou sulfures.

Dans ce travail, certains de ces groupes d'incultivés (RC-V, MBG-D, ou DHVE-4) sont métaboliquement actifs dans les sédiments associés au tapis orange du volcan de boue Napoli, ou dans les sédiments associés à la zone Storegga. Cependant, les RC-V sont trouvés en majorité dans les sédiments de la zone Storegga, alors que les MBG-D représentent la majorité des séquences obtenues à partir des sédiments recouverts du tapis microbien orange du volcan de boue Napoli (Figure 29). Une différence essentielle entre les deux habitats analysés est l'intensité des flux de fluides. Par contre il est difficile de spéculer quant aux différences de concentrations de méthane entre ces deux zones. Il est possible que les RC-V soient mieux adaptés à des sédiments soumis à des flux de fluides modérés. Les fortes concentrations en sels caractéristiques du volcan de boue Napoli pourraient expliquer la présence majoritaire des séquences de MBG-D métaboliquement actives. En effet, ce groupe a été trouvé dans de nombreux sédiments montrant de fortes concentrations en sels (Benlloch *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2005; Lloyd, 2006; Omoregie, 2008; Jiang *et al.*, 2008).

III - Les communautés méthanogènes

III-1 - Centres actifs des volcans de boue Napoli et Amsterdam

Les volcans de boue Napoli et Amsterdam, situés à environ 1940 et 2045 m mètres de fond, sont localisés respectivement sur les sites d'Olimpi et les Monts Anaximandre, appartenant à la Ride Méditerranéenne. Le centre dit actif d'un volcan de boue ne représente pas systématiquement son centre physique sur les cartes. Souvent les expulsions de boue "fraîches" sont caractérisées par de forts gradients thermiques et géochimiques. La détermination des gradients de température à l'aide de carottiers équipés de sondes thermiques dans les centres des volcans de boue sous-marins renseigne sur l'intensité des émissions de fluides (gaz, boue et eau). Les données de cartographie haute résolution et la mesure des gradients thermiques facilitent l'identification du centre actif d'un volcan. Les températures élevées mesurées dans les sédiments de surface du centre du volcan de boue Amsterdam (36°C pour KUL-7 et 20°C pour KUL-5 proche de KUL-6 à 6 m sous le plancher océanique; Jean Paul Foucher, communications personnelles) sont certainement le résultat d'une expulsion de boue intense provenant d'un réservoir profond et chaud. Les différences de gradients thermiques et les anomalies observées sont des témoins indirects de l'activité d'un volcan. Ainsi, l'absence d'anomalie thermique indique un état quiescent du volcan sous-marin comme par exemple le volcan de boue Napoli. D'autre part, l'importance de l'anomalie thermique est directement proportionnelle à la taille du conduit. Enfin, plus la température mesurée est élevée et plus la source des boues et des fluides est profonde. Les gradients thermiques mesurés sur le centre du volcan de boue Amsterdam sont de 3,789°C/m soit presque quatre fois plus important que le centre du volcan Napoli (100°C/km). Le gradient thermique mesuré dans le centre du volcan Napoli est 3 à 5 fois plus élevé que le gradient moyen mesuré dans les bassins de l'est Méditerranéen (20 à 40°C/km) mais reste extrêmement faible par rapport aux valeurs relevées au niveau des volcans de boue du delta profond du Nil. Le volcan de boue Napoli est donc considéré comme un volcan quiescent caractérisé par des débits de fluides faibles.

Le travail effectué au cours de cette thèse a permis de confirmer la présence et l'activité des communautés méthanogènes dans les écosystèmes sédimentaires associés à des circulations de fluides froids riches en méthane. Pourtant, l'analyse

phylogénétique des séquences des gènes codant l'ARNr 16S et *mcrA* des échantillons de sédiments collectés sur les deux volcans de boue Napoli et Amsterdam a révélé que la majorité des phylotypes détectés sont affiliés à des groupes d'ANME probablement impliqués dans le processus d'AOM. Ces résultats suggèrent que les populations de méthanogènes représenteraient une faible proportion de la communauté *Archaea* avec des densités cellulaires faibles (Colwell *et al.*, 2008). Bien que les étapes d'amplification par PCR soient extrêmement sensibles, certaines méthanogènes nécessitent une étape d'enrichissement à l'aide de milieux de culture spécifiques pour pouvoir être détectées.

Des mesures d'activité de méthanogenèse dans les sédiments des centres des volcans de boue Napoli et Amsterdam montrent qu'il y a eu production active de méthane.

L'intensité des flux de fluides semble avoir une influence sur les taux d'activités de méthanogenèse. En effet, tous substrats confondus, la méthanogenèse est 10 fois plus importante dans les sédiments du volcan de boue Amsterdam, dans lequel les flux sont plus presque 10 fois plus intenses que sur le volcan de boue Napoli. Il est possible que les fluides ascendants plus intenses sur le volcan de boue Amsterdam soient accompagnés de boues riches en substrats et sources d'énergie pour les méthanogènes.

Les mesures d'activité montrent une méthanogenèse acétoclaste (maximum de 0,1625 nanomoles de CH₄ par jour et par cm³ de sédiments), hydrogénotrophe (max: 38,8 picomoles de CH₄ par jour et par cm³ de sédiments) et méthylotrophe dont les substrats cataboliques respectifs sont: acétate, CO₂, méthylamine, méthanol. Ces mesures d'activités sont comparables aux activités mesurées dans d'autres sédiments marins (méthanogenèse acétoclastique: comprise entre 0,02 et 6 nmol.cm⁻³.jour⁻¹ (Parkes *et al.*, 2007); et méthanogenèse hydrogénotrophe: comprise entre 0,4 et 30 nmol.cm⁻³.jour⁻¹ (Newberry *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 2007).

Les méthanogènes acétoclastes ou hydrogénotrophes semblent être dépendant des conditions environnementales (température, salinité, flux de méthane). La méthanogenèse acétoclastique est plus élevée dans les sédiments du volcan de boue Amsterdam, probablement en raison des températures élevées en profondeur (jusque 50°C à 9 m). Dans les sédiments l'acétate peut avoir une origine

biogénique et/ou thermogénique. Ainsi, les fortes concentrations en acétate relevées (de 99 à 2119 μM) dans les eaux interstitielles des sédiments du volcan de boue Amsterdam reflètent probablement un craquage à haute température dans les couches sédimentaires profondes et chaudes (Wellsbury *et al.*, 1997). L'acétate est le produit de la fermentation de la matière organique ainsi que de la réduction du CO_2 (acétogénèse), et l'acétate est un substrat important pour les sulfato-réductrices et les méthanogènes (Liu et Whitman, 2008). Les concentrations en acétate dans les sédiments marins sont donc le résultat de la balance entre sa consommation et sa production par les communautés microbiennes, qui maintiennent des concentrations basses en acétate ($<15\mu\text{M}$) dans les couches superficielles du sédiment (Wellsbury *et al.*, 1997). Or les concentrations en acétate demeurent très élevées même dans les sédiments de surface du volcan de boue Amsterdam. Il est possible que les flux ascendants intenses, provenant de réservoirs profonds et chauds donc riches en acétate, aient enrichi les sédiments de surface en acétate.

La méthanogénèse hydrogénotrophe domine dans les sédiments du volcan de boue Napoli, probablement parce que les acétoclastes tolèrent moins les fortes salinités (5085 mM de Cl^- à 130 cm de profondeur dans les sédiments du volcan de boue Napoli) que les hydrogénotrophes ($<10\%$ de salinité, Oren, 1999). L'espèce méthanogène la plus halotolérante des hydrogénotrophes est *Methanocalculus halotolerans*, isolée dans un puit de pétrole. Cette souche peut supporter jusqu'à 12% de NaCl (Ollivier *et al.*, 1998). Seules les espèces appartenant au genre *Methanohalophilus* peuvent tolérer de fortes salinités pour leur croissance (de 1 à 2,5 M de NaCl, Garcia *et al.*, 2000). Ces méthanogènes ont été isolés de sédiments hypersalés d'un lac en Utah. Des séquences de gènes *mcrA* affiliés au genre *Methanohalophilus*, ont été détectés dans le lac de saumures anoxique "Atalante" situé en mer Méditerranée (Yakimov *et al.*, 2007). Or nous n'avons détecté aucune séquence affiliée aux méthanogènes halophiles connus. Il est donc possible: (i) que nous n'avons pas pu les détecter faute de milieux de culture adaptés ou faute d'une couverture exhaustive des banques de gènes *mcrA*, ou (ii) que les séquences des gènes *mcrA* affiliés à des méthanogènes détectés dans les sédiments du volcan de boue Napoli appartiennent à nouvelles lignées de méthanogènes halophiles.

Une activité de méthanogénèse méthylotrophe (à partir de composés méthylés) a été mesurée dans toutes les couches de sédiment analysées pour les

deux volcans de boue, avec un maximum d'activité dans les sédiments de surface. Contrairement à la vision classique de la zonation sédimentaire déterminée par la disponibilité des différents accepteurs et donneur d'électrons selon un gradient d'oxydo-réduction, les populations de méthanogènes méthylotrophes des centres de volcans de boue sont présentes et actives dans les sédiments de surface riches ou pauvres en sulfate, ou encore dans les zones de transition méthane-sulfate. Dans les sédiments riches en sulfate les méthanogènes sont confrontées à d'autres populations bactériennes compétitrices comme les sulfato-réductrices et/ou les acétogènes qui sont également des consommatrices d'hydrogène et/ou d'acétate (Garcia *et al.*, 2000). La compétition vis-à-vis des sources d'énergie mais également des sources de carbone (comme l'acétate) entre les différents métabolismes va dépendre de la thermodynamique (énergie libre) et de la cinétique (affinité pour le substrat).

Or la présence et l'activité de populations méthanogènes méthylotrophes pourrait s'expliquer par la présence de substrats organiques dits non compétitifs, c'est à dire qui ne sont pas assimilés par les bactéries sulfato-réductrices, tels que les composés méthylés (méthylamines, méthanol, ...). Ces composés méthylés sont dérivés entre autres de carcasses d'animaux, de détritrus provenant des tapis microbiens, ou de la dégradation des algues. De plus, Chaban *et al.* (2006) ont remarqué que seuls des méthanogènes qui utilisent les méthylamines sont trouvés dans les environnements halophiles extrêmes.

Typiquement, les *Archaea* de l'ordre des *Halobacteriales* utilisent des concentrations intracellulaires élevées en KCl pour se développer dans des écosystèmes hypersalés (Oren, 1999). Cependant, les méthanogènes méthylotrophes utilisent une autre stratégie portant sur l'utilisation de solutés compatibles. La synthèse des solutés compatibles représente une solution plus coûteuse d'un point de vue énergétique pour lutter contre les fortes osmolarités de leur habitat. Les rendements énergétiques de la méthanogénèse méthylotrophe, à partir de méthylamines (Δ° entre -91 et -191 kJ) semblent cependant favorables avec la stratégie impliquant la synthèse de solutés compatibles (Oren, 1999).

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les populations de méthanogènes sont ubiquistes et capables de s'adapter à des environnements géochimiques variables et dynamiques incluant: (i) concentrations variables en méthane et sulfate, (ii) milieux hypersalés jusqu'à 5085 mM de chlorure, et (iii) températures modérées de 14 à 25 °C favorable aux psychrophiles.

III-2 - Sédiments de pockmarks ou recouverts de tapis microbiens

Des séquences affiliées aux méthanogènes appartenant au genre hydrogénotrophe *Methanogenium* ont été détectées dans des cultures d'enrichissement à partir de sédiments de surface du pockmark G11 de la zone Nyegga. La présence simultanée de BSR et de méthanogènes hydrogénotrophes dans les couches sédimentaires est énigmatique, puisque les BSR sont plus efficaces que les hydrogénotrophes pour utiliser l'H₂. Il est donc possible que les hydrogénotrophes présentes dans des sédiments riches en sulfate, utilisent d'autres sources d'énergie alternatives, qui sont associées à une croissance plus lente, mais qui ne sont pas utilisées par les BSR, comme le formate (Garcia *et al.*, 2000).

Des séquences affiliées aux *Methanosarcinales*, principalement composées de méthanogènes méthylotrophes, ont aussi été détectées dans les sédiments du pockmark G11 de Nyegga. Dans les sédiments de surface associés au tapis microbien du volcan de boue Napoli, les cultures d'enrichissement ont montré la présence de méthanogènes méthylotrophes du genre *Methanococoides*. Enfin, dans les sédiments de pockmarks du delta profond du Nil, des séquences affiliées à des méthanogènes de l'ordre des *Methanosarcinales* ont été détectées. Ces résultats semblent confirmer l'omniprésence des méthanogènes méthylotrophes, dans différents environnements géochimiques.

Il est probable que les cellules se trouvant dans les sédiments où il existe des migrations de fluides intenses proviennent de réservoirs profonds de la biosphère souterraine. Ainsi, il y aurait une connexion entre les écosystèmes de surface froids et les réservoirs profonds chauds, grâce à la circulation des fluides dans la couche sédimentaire. Les communautés microbiennes dans les sédiments des structures géologiques trouvées sur le plancher sous-marin des marges continentales seraient

donc des fenêtres ouvertes sur la diversité des communautés microbiennes de la biosphère profonde.

IV - Diversité des communautés *Archaea* oxydant le méthane

IV-1 – Diversité des *Archaea* méthanotrophes anaérobies en fonction des intensités de flux de fluides

Notre étude montre des différences dans les groupes d'ANME dominants selon les différents types d'environnements géochimiques étudiés. Les analyses phylogénétiques des séquences des gènes *mcrA* révèlent que les phylotypes détectés dans les banques de clones sont affiliés principalement aux *Archaea* ANME-1 pour les sédiments des centres des volcans de boue Napoli et Amsterdam, quelque soit la profondeur des sédiments analysés (Figure 28).

Les sédiments de tapis microbiens, que ce soit dans la zone Nyegga ou dans le volcan de boue Napoli, et du delta profond du Nil, sont dominés par des séquences affiliées aux *Archaea* ANME-2 (Figure 28). Il est possible que les sédiments associés aux tapis microbiens soient soumis à des flux de fluides moins intenses que les sédiments des centres actifs des volcans de boue (Niemann *et al.*, 2006).

Par conséquent, nos résultats semblent corroborer les hypothèses selon lesquelles les ANME-1 seraient avantagées par rapport aux ANME-2 dans des habitats dominés par des flux de fluides intenses (Girguis *et al.*, 2005; Knittel *et al.*, 2005).

IV-2 – Diversité des *Archaea* méthanotrophes anaérobies dans les sédiments de pockmarks

Des sédiments associés à des pockmarks ont été analysés dans deux zones géographiquement distinctes des marges continentales Norvégienne et Méditerranéenne (pockmark G11 de la zone Nyegga, pockmarks du delta profond du Nil). A notre connaissance, il existe à ce jour très peu d'études relatives aux communautés microbiennes des sédiments de pockmarks (Bouloubassi *et al.*, 2009; Cambon-Bonavita *et al.*, 2009; Omoregie *et al.*, 2009).

Dans les sédiments du pockmark G11 de la zone Nyegga, nous avons détecté des séquences affiliées aux ANME appartenant aux trois clades identifiés connus (ANME-1, 2 et 3). Les inventaires des gènes codant l'ARNr 16S obtenus par RT-PCR ont mis en évidence que les membres des ANME-2 étaient métaboliquement actifs dans les sédiments du pockmark G11 de la zone Nyegga. La majorité des séquences obtenues ont une forte similarité avec les ANME décrits comme des *Archaea* oxydant le méthane. En effet, le contenu en ribosome est généralement plus élevé dans des cellules métaboliquement actives, ainsi, il est probable que les ANME aient une activité dominante dans les échantillons de sédiment de Nyegga.

Dans les sédiments de la zone de pockmarks du delta profond du Nil, nous avons également détecté une majorité de séquences de gènes codant l'ARNr 16S affiliées aux ANME-1 et ANME-2.

Ainsi, la composition des communautés microbiennes des sédiments de pockmarks profonds ne montre pas de différences significatives par rapport aux séquences d'*Archaea* méthanotrophes anaérobies obtenues à partir de sédiments de volcans de boue, ou d'autres sédiments de zones d'émissions de fluides froids. Il semblerait que l'AOM soit un processus dominant dans les sédiments de pockmarks.

Dans l'avenir il serait intéressant de déterminer également les communautés bactériennes métaboliquement active afin de mettre en évidence une activité de sulfato-réductrices, en partenariat avec l'AOM; tout comme mesurer les taux d'AOM et de sulfato-réduction.

IV-3 – Distribution verticale des *Archaea* méthanotrophes anaérobies

De façon surprenante, nous avons détecté tous sites confondus, des séquences affiliées aux ANME dans toutes les couches de sédiments, riche ou pauvres en sulfate, et dans la ZTMS (paragraphe I).

En dépit d'une documentation significative, les processus physiologiques, biochimiques ainsi que les microorganismes impliqués dans l'AOM restent mal connus (Knittel et Boetius, 2009). Des enrichissements de consortia ANME/BSR ont été obtenus en culture stables au laboratoire, et les organismes impliqués dans l'AOM sont bien identifiés mais l'absence de cultures pures limite toute interprétation concernant les processus réels en jeu. D'autre part les séquences affiliées aux groupes d'ANME sont souvent proches de celles d'organismes méthanogènes

appartenant aux ordres *Methanosarcinales* et *Methanomicrobiales*. Les étroites relations phylogénétiques entre les *Archaea* méthanotrophes et méthanogènes et les liens biogéochimiques entre les deux voies d'assimilation du carbone suggèrent une co-évolution de leur biochimie (Knittel et Boetius, 2009). Ainsi, les observations de (méta)génomiques et biochimiques suggèrent que les *Archaea* ANME utiliseraient une voie métabolique de "méthanogenèse inverse", impliquant une enzyme MCR modifiée et dépendante du Nickel (Krüger *et al.*, 2003). Les banques de métagénomique révèlent également la présence de presque tous les gènes associés à la méthanogenèse dans des cellules d'ANME-1 et ANME-2 (Hallam *et al.*, 2004).

Une question encore d'actualité porte sur la présence ou non des deux populations distinctes d'*Archaea* méthanotrophe et méthanogène. Dans ce travail, nous avons observé une activité de méthanogenèse et des *Archaea* méthanotrophes (ANME) dans les mêmes couches de sédiment. Ces résultats ont permis de dégager plusieurs hypothèses:

- (i) la méthanogenèse et l'AOM sont effectuées par des organismes phylogénétiquement proches mais distincts, capables de fonctionner en synergie pour recycler le méthane (Parkes *et al.*, 2007),
- (ii) les *Archaea* méthanotrophes sont capables d'inverser leur métabolisme vers la méthanogenèse et synthétisent donc du méthane.

Il est probable qu'à un instant donné, les *Archaea* méthanotrophes utilisent une seule voie métabolique, probablement en fonction des conditions environnementales (par exemple, fortes ou faibles concentrations en méthane). Le méthane pourrait donc être un facteur limitant influençant le changement métabolique de la méthanotrophie vers la méthanogenèse et vice-versa. Or, la présence de tapis microbiens denses à l'interface eau-sédiment joue un rôle de "bouchon" plus ou moins imperméable, piégeant notamment les gaz comme le méthane ou l'hydrogène sulfuré dissout dans les fluides advectifs ascendants. Ce piégeage biologique entraîne probablement une augmentation locale des concentrations en méthane dans les sédiments sous-jacents riches en sulfate (Lanoil *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2005). Nous avons également montré la présence de méthanogènes dans les sédiments situés en dessous des tapis microbiens qui pourraient aussi contribuer à une augmentation locale des concentrations de méthane (exemple des sédiments de surface du pockmark G11 de la zone Nyegga). Dans ces conditions, des fortes concentrations en méthane pourraient induire ou stimuler les *Archaea* méthanogènes.

Les expériences conduites au cours de ce travail de thèse ont permis de proposer plusieurs hypothèses relatives à la diversité observée et le fonctionnement des écosystèmes sédimentaires étudiés au niveau des marges continentales européennes montrées figure 31.

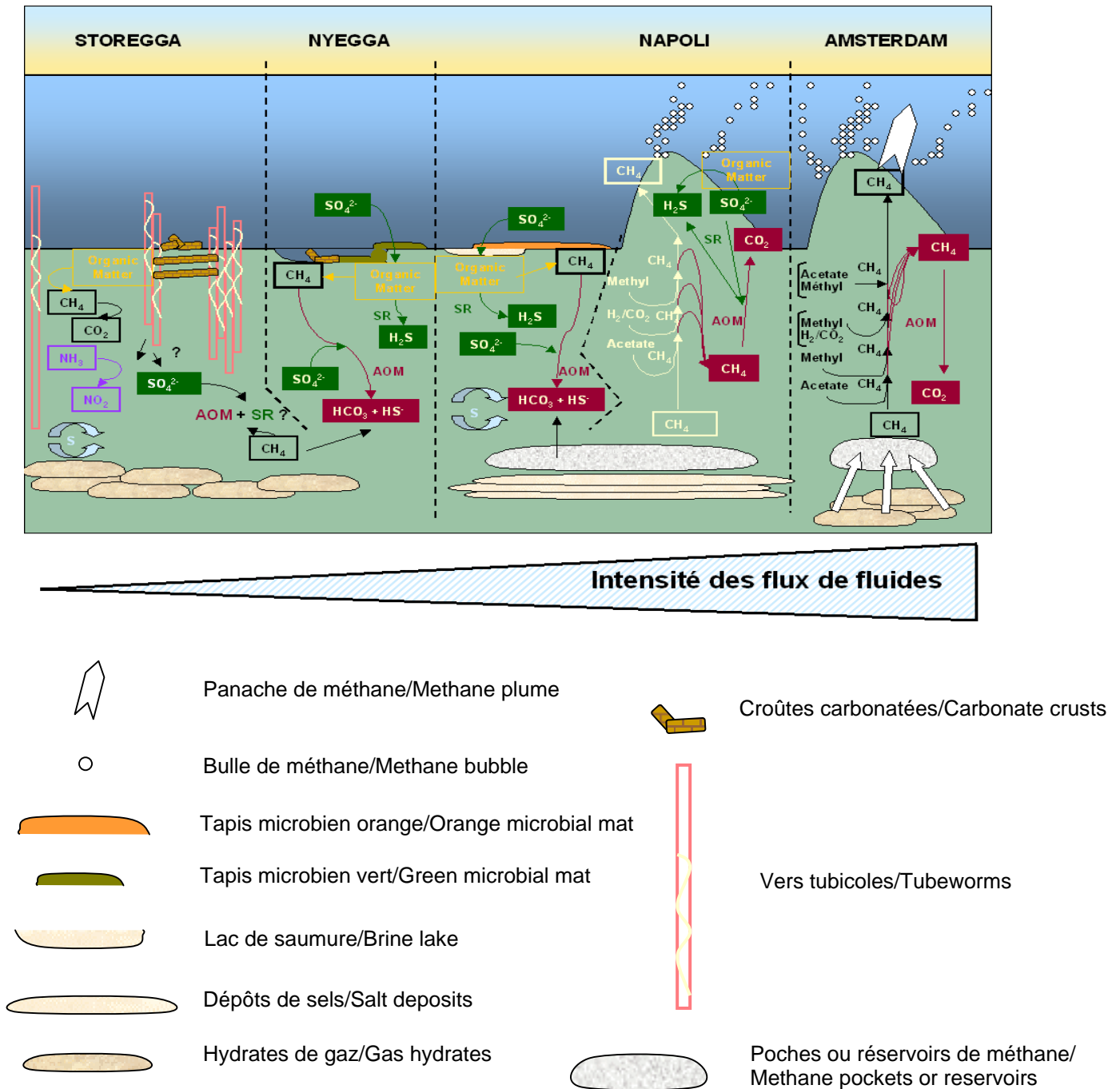


Figure 31: Représentation schématique des processus microbiens potentiellement impliqués dans le cycle du méthane des sédiments du centre des volcan de boue Amsterdam et Napoli, des sédiments couvert de mat orange (Napoli) collectés sur la marge continentale méditerranéenne, ainsi que des sédiments du pockmark G11 de Nyegga, et de Storegga de la marge continentale norvégienne.

**CONCLUSIONS
et
PERSPECTIVES**

Ce travail de thèse a permis d'élargir les connaissances sur la diversité des communautés microbiennes, et en particulier:

- La distribution verticale des communautés *Archaea*, grâce à l'utilisation de techniques moléculaires de PCR-DGGE et d'inventaires d'ADNr 16S,
- La diversité et la fonction des microorganismes des sédiments de marges continentales soumis à des émissions de fluides froids riches en méthane, par l'intermédiaire d'inventaires de gènes métaboliques spécifiques de la méthanogenèse, de la méthanotrophie anaérobie et de la sulfato-réduction,
- L'activité des méthanogènes grâce à la mesure des taux d'activité à l'aide de substrats radioactifs de la méthanogenèse, et
- La diversité des communautés métaboliquement actives par l'intermédiaire d'inventaires d'ADNr 16S dérivés de l'ARNr.

Malgré l'importance des communautés méthanogènes dans les écosystèmes sédimentaires associés aux migrations de fluides froids dans les marges continentales, très peu de signatures moléculaires de méthanogènes ont été identifiées. Il semblerait que les *Archaea* méthanotrophes anaérobies dominent les écosystèmes des zones d'émissions de fluides froids.

Afin de poursuivre l'étude sur ces écosystèmes marins associés aux marges continentales, les inventaires des ADNr 16S et d'autres gènes métaboliques du domaine *Bacteria* devraient être réalisés (par exemple les bactéries acétogènes, syntrophiques, hétérotrophes ou les BSR). Il serait aussi intéressant de quantifier les populations cellulaires méthanogènes et/ou méthanotrophes au sein des *Archaea*, et au sein de la population microbienne totale; afin de vérifier par exemple si les méthanogènes représentent effectivement une très faible proportion des microorganismes dans les sédiments marins. Des études portant sur l'hybridation *in situ* faciliteraient l'interprétation des résultats, notamment les associations syntrophiques entre ANME et BSR dans les sédiments de pockmarks. Enfin, les études culturales des microorganismes apportent une information importante sur la diversité des communautés microbiennes dans les écosystèmes étudiés.

Un autre aspect non négligeable mis en exergue par cette étude est l'importance des données géochimiques relatives aux sédiments étudiés, notamment les concentrations en CH₄, mais aussi en O₂, ammoniac, sulfures, ou H₂. Il est en effet essentiel d'avoir ces données (si possible *in situ*) afin de tenter d'expliquer la distribution et l'activité des communautés microbiennes. Il serait aussi intéressant de coupler les résultats de la diversité microbienne avec l'observation des communautés chimiosynthétiques en surface, qui sont un indicateur des processus physiques et biologiques se déroulant dans les sédiments. Ainsi il serait utile de mettre en place des approches multidisciplinaires, pour mettre en relation les données de géologie, géochimie, biologie, microbiologie; aboutissant ainsi à une vision globale des processus et cycles se déroulant dans les écosystèmes des marges continentales froides.

De nombreux groupes d'*Archaea* incultivées ont été détectés lors de ce travail de thèse. Des hypothèses quant à leurs rôles respectifs ont été proposées, en se basant notamment sur les caractéristiques géochimiques des différents environnements dans lesquels ils ont été détectés. Il semble crucial de déterminer le rôle physiologique de ces groupes d'*Archaea* omniprésentes dans les écosystèmes de sédiments marins. Ainsi l'emploi de technologies innovantes pourrait permettre de lever un certain nombre de verrous scientifiques. Pour n'en citer que quelques exemples:

- la technique de métagénomique, qui est basée sur la construction de banques de fosmides, et permet d'analyser un génome entier pour avoir une meilleure compréhension des capacités métaboliques du/des microorganisme(s) étudié(s) dans un environnement donné.
- la technique de SIP (Stable Isotope Probing) basée sur l'incorporation de substrats marqués avec des isotopes stables au sein de communautés microbiennes et le suivi de ces substrats marqués en utilisant des techniques moléculaires classiques pour déterminer l'identité des organismes ayant ingéré les substrats marqués. Le SIP permet donc de faire un lien entre organismes ou groupe d'organismes avec des fonctions spécifiques dans un environnement naturel.

- la technique de NanoSIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), est un procédé d'analyse de la surface (2D) et de volume (3D) jusqu'à des profondeurs de quelques microns, qui permet de mesurer la composition chimique élémentaire, isotopique ou moléculaire d'un échantillon. La technique permet de visualiser des sondes nucléotidiques hybridées à des cellules individuelles. Sa sensibilité (limite de détection ou détection de traces) et sa résolution spatiale latérale de l'ordre de 50 nm en font un outil très intéressant. Le nanoSIMS couplé aux techniques SIP permet de lier l'identité de cellules individuelles avec leur activité métabolique dans un environnement naturel complexe

- la culture haut débit, basée sur l'encapsulation de cellules individuelles dans des microbilles, permettant aux cellules de croître avec des substrats aux concentrations trouvées dans leur environnement naturel. Cette technique pourrait donc améliorer nos chances de cultiver des organismes jusqu'ici uncultivés.

Enfin, le programme HERMES qui a pris fin depuis le mois de mars 2009 est poursuivi par le projet européen HERMIONE (Hotspot Ecosystem Research and Man's Impact on European Seas) démarré en avril 2009. Les buts principaux de ce nouveau programme seront de comprendre les changements dans les écosystèmes de mers profondes liés à des facteurs clés tels que le changement climatique ou les impacts anthropologiques; et d'étudier les capacités biologiques et les adaptations spécifiques des organismes marins. Comprendre ces écosystèmes est crucial, puisqu'ils sont touchés et perturbés par les changements climatiques, et l'impact de l'Homme à travers la pêche intensive, les extractions des ressources de plus en plus loin des côtes, les installations en mer ou la pollution.

La présence de microorganismes dans les couches de sédiments marins peu profonds conduit à se questionner sur l'origine de ces cellules. Il est possible que ces cellules remontent de réservoirs ou sources beaucoup plus enfouis appartenant à la biosphère profonde, environnement extrême dans laquelle les méthanogènes semblent dominer. Aussi, du méthane a été détecté dans l'atmosphère de Mars. Des études menées sur Terre, dans des écosystèmes basés sur les méthanogènes, et ayant des conditions géochimiques analogues aux conditions trouvées sur Mars pourraient faciliter les recherches de vie extra-terrestre sur d'autres planètes.

CONCLUSIONS and PERSPECTIVES

The results obtained in this study allowed to broaden our knowledge on microbial community diversity, and specifically:

- Vertical distribution of archaeal communities, using molecular methods such as PCR-DGGE, and 16S rDNA gene inventories,
- Diversity and function of microorganisms in cold seep ecosystems, by monitoring metabolic specific genes targeting methanogenesis, anaerobic oxidation of methane, and sulfate-reducing processes,
- Activity of methanogens, by measuring activity rates using radiotracers for methanogenesis, and
- Diversity of metabolically active archaeal communities, using RNA-derived 16S rRNA genes.

Despite the significance of methanogenesis in continental margin sedimentary cold seep ecosystems, only few methanogenic sequences were identified. It would seem that methanotrophic anaerobic *Archaea* dominated archaeal communities in these cold seep environments.

In order to pursue studies on continental margin marine ecosystems, it would be interesting to analyse the diversity of other specific metabolic genes of the *Bacteria* (targeting for example acetogens, syntrophic or heterotrophic bacteria, and SRB). Quantification of the fraction of methanogens and/or methanotrophs in the archaeal populations, or in total microbial populations, could allow to confirm that methanogens represent a small portion of the microbial community in marine sediments. Using a mixed culture- and culture independent- procedure seems to remain the best way to assess microbial diversity in a given environment.

Importance of geochemical sedimentary data was also put forward during this study, such as pore water concentrations of methane, oxygen, sulfide, or ammonia. Information on these contents is essential in order to explain the observed microbial diversity. It is also interesting to link microbial diversity with observations of the

chemosynthetic communities on the overlying seafloor, which are visible indicators of physical and biological processes occurring in sediments.

A great number of uncultured archaeal groups were detected in the marine sediments analysed in this work, as well as in many previous studies. Hypothetic roles of these archaeal uncultured groups in marine ecosystems were suggested based on the geochemical environments in which they were detected. It seems crucial to determine the physiology of these groups that are omnipresent in gene libraries of marine sediment ecosystems. Thus, use of novel technologies could help solve these questions, such as metagenomics, SIP (Stable Isotope Probing), NanoSIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), or high throughput cultivation methods.

Finally, the european HERMES program, with which was affiliated this PhD research, ended in march 2009. The european HERMIONE project (Hotspot Ecosystem Research and Man's Impact on European Seas), which started in april 2009 relayed the HERMES program. Its main goals are to understand changes linked to key factors such as climate changing or human impacts in deep sea ecosystems, and to study the biological adaptation capacities of marins organisms.

Presence of microorganismes in marine sediments puts forth questions on the origin of these cells. It is possible that these cells come from deep reservoirs. This extreme environment tends to be dominated by methanogens. Also, as methane was detected on Mars, studies carried out on Earth in ecosystems with analogous geochemical conditions, could help researches on extra-terrestrial life.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

A

Abreu, C., Jurgens, G., De Marco, P., Saano, A., and Bordalo, A.A. (2001) Crenarchaeota and Euryarchaeota in temperate estuarine sediments. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 713-718.

B

Bahr, M., Crump, B.C., Klepac-Ceraj, V., Teske, A., Sogin, M.L., and Hobbie, J.E. (2005) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. *Environ. Microbiol.* **7**: 1175–1185.

Bak, F., and Pfennig, N. (1991) Microbial sulfate reduction in littoral sediment of lake constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**:31-42.

Banning, N., Brock, F., Fry, J.C., Parkes, R.J., Hornibrook, E.R.C., and J, W.A. (2005) Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. *Environ. Microbiol.* **7**: 947 - 960.

Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009) Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. *Science* **325**: 184-187.

Bechte, A. and Püttmann, W. (1991) The origin of the Kupferschiefer-type mineralization in the Richeldorf Hills, Germany as deduced from stable isotope and organic geochemical studies. *Chem. Geol.* **91**:1-18.

Benloch, S., López-López, A., Casamayor, E.O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F.L. *et al.* (2002) Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ. Microbiol.* **4**: 349-360.

Berndt, C. (2005) Focused fluid flow in passive continental margins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A.* **363**: 2855-2871.

Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Llyod, K.G., Sorensen, K.B., Anderson, R. *et al.* (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 3846-3851.

Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., and Gieske, A. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.

Boetius, A. (2005) Microfauna–Macrofauna Interaction in the Seafloor: Lessons from the Tubeworm. *PLoS Biol.* **3**: 375-378.

Boon, N., de Windt, W., Verstraete, W., and Top, E.M. (2002) Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**: 101-112.

Boone, D.R., and Whitmann, W.B. (1988) Proposal of minimal standards for describing new taxa of methanogenic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 212-219.

Boone, D.R., and Castenholz, R.W. (2001) The Archaea and the deeply branching phototrophic Bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Staley, J.T., Boone, R.B., Brenner, D.J., Castenholz, R.W., Garrity, G.M., Goodfellow, M., Krieg, N.R., Rainy, F.A., and Schleifer, K.-H. (eds). Springer New York: 2nd edn, p.339.

Bouloubassi, I., Nabais, E., Pancost; R.D., Lorre, A., and Taphanel, M.-H. (2009) First biomarker evidence for methane oxidation at cold seeps in the Southeast Atlantic (REGAB pockmark). *Deep Sea Res. II* **56**: 2239–2247.

Briée, C., Moreira, D., and Lopez-Garcia, P. (2007) Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Res. Microbiol.* **158**: 213-227.

Brown, H.E., Holbrook, W.S., Hornbach, M.J., and Nealon, J. (2006) Slide structure and role of gas hydrate at the northern boundary of the Storegga slide, offshore Norway. *Mar. Geol.* **229**: 179-186.

C

Cambon-Bonavita, M.A., Nadalig, T., Roussel, E., Delage, E., Duperron, S., Caprais,

- J.C, Boetius, A., and Sibuet, M. (2009) Diversity and distribution of methane-oxidizing microbial communities associated with different faunal assemblages in a giant pockmark of the Gabon continental margin. *Deep Sea Res. II* **56**: 2248–2258.
- Castro, H.F.**, Williams, N.H., and Ogram, A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 1-9.
- Chaban, B.**, Ng, S.Y.M., and Jarrell, K.F. (2006) Archaeal habitats — from the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* **52**: 73–116.
- Chaduteau, C.** (2008) Origine et circulation des fluides dans les sédiments des marges, Contribution de l'hélium et du méthane dans la compréhension des processus, Etude de 2 zones. Thèse. Université de Bretagne Occidentale, France.
- Chang, Y.-J.**, Peacock, A.D., Long, P.E., Stephen, J.R., McKinley, J.P., MacNaughton, S.J. *et al.* (2001) Diversity and Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in Groundwater at a Uranium Mill Tailings Site. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3149–3160.
- Cheng, Y.F.**, Mao, S.Y., Liu, J.X., and Zhu, W.Y. (2009) Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**: 585–592.
- Chenna, R.**, Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., and Thompson, J.D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3497-3500.
- Chong, S.C.**, Liu, Y., Cummins, M., Valentine, D.L., and R, B.D. (2002) Methanogenium marinum sp. nov., a H₂-using methanigen from Skan Bay, Alaska, and kinetics of H₂ utilization. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 263-270.
- Corliss, J.B.**, Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., von Herzen, R.P., Ballard, R.D. *et al.* (1979) Submarine Thermal Springs on the Galapagos Rift. *Science* **203**: 1073-1083.
- Colwell, F.S.**, Boyd, S., Delwiche, M.E., Reed, D.W., Phelps, D.W., and Newby, D.T. (2008) Estimates of biogenic methane production rates in deep marine sediments at Hydrate Ridge, Cascadia Margin. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3444-3452.
- Cook, K.L.**, Whitehead, T.R., Spence, C., and Cotta, M.A. (2008) Evaluation of the sulfate-reducing bacterial population associated with stored swine slurry. *Anaerobe* **14**: 172–180.
- Cowen, J.P.**, Giovannoni, S.J., Kenig, F., Johnson, H.P., Butterfield, D., Rappé, M.S. *et al.* (2003) Fluids from Aging Ocean Crust That Support Microbial Life. *Science* **299**: 120-123.

D

DeLong, E.F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 5685-5689.

DeLong, E., F, Wu, K.Y., Prézelin, B.B., and Jovine, R.V.M. (1994) High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**: 695-697.

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., Llyod, 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.

D'Hondt, S., Rutherford, S., and Spivack, A.J. (2002) Metabolic Activity of Subsurface Life in Deep-Sea Sediments. *Science* **295**: 2067-2070.

Dimitrov, L.I. (2003a) Mud volcanoes-a significant source of atmospheric methane. *Geo-Mar. Lett.* **23**: 155-161.

Dimitrov, L., and Woodside, J. (2003b) Deep sea pockmark environments in the eastern Mediterranean. *Mar. Geol.* **195**: 263-276.

- Dojka, M.A.**, Hugenholtz, P., Haack, S.K., and Pace, N.R. (1998) Microbial Diversity in a Hydrocarbon- and Chlorinated-Solvent-Contaminated Aquifer Undergoing Intrinsic Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3869-3877.
- Drake, H.L.**, and Akagi, J.M. (1978) Dissimilatory Reduction of Bisulfite by *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Bacteriol.* **136**: 916-923.
- Dupré, S.**, Woodside, J., Foucher, J.-P., Lange, G., Mascle, J., Boetius, A. *et al.* (2007) Seafloor geological studies above active gas chimneys off Egypt (Central Nile Deep Sea Fan). *Deep Sea Res. I* **54**: 1146-1172.
- E**
- Emrich, S.J.**, Lowe, M., and Delcher, A.L. (2003) PROBEmer: a web-based software tool for selecting optimal DNA oligos. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3476-3750.
- Elsgaard, L.**, Prieur, D., Mukwaya, G.M., and Jorgensen, B.B. (1994) Thermophilic sulphate reduction in hydrothermal sediment of lake Tanganyika, East Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1473-1480.
- F**
- Ferry, J.G.**, and Lessner, D.J. (2008) Methanogenesis in marine sediments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 147-157.
- Friedrich, M.W.** (2005) Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea. *Meth. Enzymol.* **397**: 428-442.
- Fuhrman, J.A.**, McCallum, K., and Davis, A.A. (1992) Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**: 148-149.
- G**
- Galand, P.E.**, Lovejoy, C., and Vincent, W.F. (2006) Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **44**: 115-126.
- Garcia, J.-L.**, Patel, B.K.C., and Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**: 205-226.
- Girguis, P.R.**, Orphan, V.J., Hallam, S.J., and DeLong, E.F. (2003) Growth and Methane Oxidation Rates of Anaerobic Methanotrophic Archaea in a Continuous-Flow Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5472-5482.
- Girguis, P.R.**, E, C.A., and DeLong, E.F. (2005) Growth and Population Dynamics of Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous-Flow Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3725-3733.
- Glissmann, K.**, Chin, K.-J., Casper, P., and Conrad, R. (2004) Methanogenic Pathway and Archaeal Community Structure in the Sediment of Eutrophic Lake Dagow: Effect of Temperature. *Microb. Ecol.* **48**: 389-399.
- Gontharet, S.**, Pierre, C., Blanc-Valleron, M.-M., Rouchy, J.M., Fouquet, Y., Bayon, G. *et al.* (2007) Nature and origin of diagenetic carbonate crusts and concretions from mud volcanoes and pockmarks of the Nile deep-sea fan (eastern Mediterranean Sea). *Deep Sea Res. II* **54**: 1292-1311.
- Grosskopf, R.**, Stubner, S., and Liesack, W. (1998) Novel Euryarchaeotal Lineages Detected on Rice Roots and in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4983-4989.
- H**
- Hales, B.A.**, C, E., Titchie, D.A., Hall, G., W, P.R., and R, S.J. (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 668-675.
- Hallam, S.J.**, Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing Archaea. *Appl.*

Environ. Microbiol. **69**: 5483-5491.

Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**: 1457-1462.

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

Hoehler, T.M., Alperin, M.J., Albert, D.B., and Martens, C.S. (1994) Field and Laboratory Studies of Methane Oxidation in an Anoxic Marine Sediment: Evidence for a Methanogen-Sulfate Reducer Consortium *Global Biogeochem. Cycles* **8**: 451-463.

Huguen, C., Mascle, J., Woodside, J., Zitter, T., and Foucher, J.P. (2005) Mud volcanoes and mud domes of the Central Mediterranean Ridge: Near-bottom and in situ observations. *Deep-sea research Part I* **52**: 1911-1931.

I

Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K. *et al.* (2003) Microbial Communities Associated with Geological Horizons in Coastal Subseafloor Sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7224-7235.

Inagaki, F., Tsunogai, U., Suzuki, M., Kosaka, A., Machiyama, H., Takai, K. *et al.* (2004) Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxrA*, *mcrA*, and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7445-7455.

Inagaki, F., Nunoura, T., Satoshi, N., Teske, A., Lever, M., Lauer, A. *et al.* (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 2815-2820.

Iversen, N., and Jorgensen, B.B. (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnol. Oceanogr.* **30**: 944-955.

J

Jerosch, K., Schlüter, M., Foucher, J.-P., Allais, A.-G., Klages, M., and Edy, C. (2007) Spatial distribution of mud flows, chemoautotrophic communities, and biogeochemical habitats at Håkon Mosby Mud Volcano. *Mar. Geol.* **243**: 1-17.

Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Ye, Q., Shen, J., Rowe, H., and Zhang, C. (2008) Dominance of putative marine benthic Archaea in Qinghai Lake, north-western China. *Environ. Microbiol.* **10**: 2355-2367.

Jorgensen, B.B. (1994) Sulfate reduction and thiosulfate transformations in a cyanobacterial mat during a diel oxygen cycle. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**:303-312.

Jorgensen, B.B., Böttcher, M.E., Lüschen, H., Neretin, L.N., and Volkov, I.I. (2004) Anaerobic methane oxidation and a deep H₂S sink generate isotopically heavy sulfides in Black Sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**: 2095-2118.

Jorgensen, B.B., and Kasten S. (2006) Sulfur cycling and methane oxidation. In *Marine Geochemistry*, Schulzn H.D., and Zabel M. (eds). Springer New York: 2nd edn, pp.271-309.

K

Kendall, M.M., Wardlaw, G.D., Tang, C.F., Bonin, A.S., Liu, Y., and Valentine, D.L. (2007) Diversity of Archaea in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 407-414.

Klein, M., Friedrich, M., Roger, A.J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H. *et al.* (2001) Multiple Lateral Transfers of

- Dissimilatory Sulfite Reductase Genes between Major Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *J. Bacteriol.* **183**: 6028–6035.
- Knittel, K.**, Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic Archaea at cold seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 467-479.
- Knittel, K.**, and Boetius, A. (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 311–334.
- Könneke, M.**, Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- Kormas, K.A.**, Smith, D.C., Edgcomb, V., and Teske, A. (2003) Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai Trough sediments (ODP Leg 190, Site 1176). *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 115-125.
- Krüger, M.**, Meyerdierks, A., Glöckner, F.O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Kahnt, J., Böcher, R., Rudolf, K., Thauer, R.K., and Shim, S. (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**: 878-881.
- Kumar, S.**, Tamura, K., and Nei, M. (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Kvenvolden, K.A.** (1988) Methane hydrates-A major reservoir of carbon in the shallow geosphere ? *Chem. Geol.* **71**: 41-51.
- Kvenvolden, K.A.** (1995) A review of the geochemistry of methane in natural gas hydrate. *Org. Geochem.* **23**: 997-1008.
- L**
- Lafarge, V.**, Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A., and Delacroix-Buchet, A. (2004) Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5644-5650.
- Lanoil, B.D.**, La Duc, M.T., Wright, M., Kastner, M., Nealson, K.H., and Bartlett, D. (2005) Archaeal diversity in ODP legacy borehole 892b and associated seawater and sediments of the Cascadia Margin. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 167-177.
- Leloup, J.**, Quillet, L., Berthe, T., and Petit, F. (2006) Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 230–238.
- Leloup, J.**, Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jorgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ. Microbiol.* **9**: 131-142.
- Levin, L.A.** (2005) Ecology of cold seep sediments : interactions of fauna with flow, chemistry and microbes. *Oceanogr. Mar. Biol.* **43**: 1-46.
- Liu, Y.**, and Whitman, W.B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 171-189.
- Lloyd, K.G.**, Lapham, L., and Teske, A. (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b Archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7218-7230.
- Loncke, L.**, Mascle, J., and the Fanile Scientific Parties (2004) Mud volcanoes, gas chimneys, pockmarks and mounds in the Nile deep-sea fan (Eastern Mediterranean): geophysical evidences. *Mar. Petrol. Geol.* **21**: 669-689.
- Lösekann, T.**, Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3348-3362.
- Luton, P.E.**, Wayne, J.M., Sharp, R.J., and Riley, P.W. (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**: 3521-3530.

M

- Marchesi, J.R.**, Weightman, A.J., Cragg, B.A., Parkes, R.J., and Fry, J.C. (2001) Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 221-228.
- Madigan, M.**, and Martinko, J. (2007) Ecologie microbienne chapitre 19. In *Brock Biologie des microorganismes*, Pearson Education, France, p. 648.
- Masson, D.G.**, Harbitz, C.B., Wynn, R.B., Pedersen, G., and Lovolt, F. (2006) Submarine landslides : processes, triggers and hazard prediction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A.* **364**: 2009-2039.
- Michaelis, W.**, Seifert, R., Nahaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M. *et al.* (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* **297**: 1013-1015.
- Mikucki, J.A.**, Liu, Y., Delwiche, M., Colwell, F.S., and Boone, D.R. (2003) Isolation of a methanogen from deep marine sediments that contain methane hydrates, and description of *Methanoculleus submarinus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3311-3316.
- Milkov, A.** (2000) Worldwide distribution of submarine mud volcanoes and associated gas hydrates. *Mar. Geol.* **167**: 29-42.
- Mills, H.J.**, Martinez, R.J., Story, S., and Sobecky, P.A. (2004) Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with *Beggiatoa* species mat communities from Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5447-5458.
- Miyashita, A.**, Mochimaru, H., Kazama, H., Ohashi, A., Yamaguchi, T., Nunoura, T. *et al.* (2009) Development of 16S rRNA gene-targeted primers for detection of archaeal anaerobic methanotrophs (ANMEs). *FEMS Microbiol. Lett.* **297**: 31-37.
- 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.

Moussard, H., Moreira, D., Cambon-Bonavita, M.-A., Lopez-Garcia, P., and Jeanthon, C. (2006) Uncultured Archaea in a hydrothermal microbial assemblage: phylogenetic diversity and characterization of a genome fragment from a euryarchaeote. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**: 452-469.

N

Nauhaus, K., Treude, T., Boetius, A., and Krüger, M. (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environ. Microbiol.* **7**: 98-106.

Nercessian, O., Bienvenu, N., Moreira, D., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2005) Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environ. Microbiol.* **7**: 118-132.

Newberry, C.J., Webster, G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2004) Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environ. Microbiol.* **6**: 274-287.

Niemann, H., Elvert, M., Hovland, M., Orcutt, B., Judd, A., Suck, I. *et al.* (2005) Methane emission and consumption at a North Sea gas seep (Tommeliten area). *Biogeosciences* **2**: 335-351.

Niemann, H., Lösekann, T., de Beer, D., Elvert, M., Nadalig, T., Knittel, K. *et al.* (2006) Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature* **443**: 854-858.

Nunoura, T., Oida, H., Toki, T., Ashi, J., Takai, K., and Horikoshi, K. (2006) Quantification of *mcrA* by quantitative fluorescent PCR in sediments from methane seep of Nankai Trough. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**: 149-157.

O

- Ogier, J.-C.**, Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A. *et al.* (2004) Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5628-5643.
- Ollivier, B.**, Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Magot, M., Patel, B.K.C., Prensiep, G., and Garcia, J.-L. (1998) Methanocalculus halotolerans gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 821-828.
- Omoregie, E.O.**, Mastalerz, V., de Lange, G., Straub, K.L., Kappler, A., Røy, H. *et al.* (2008) Biogeochemistry and Community Composition of Iron- and Sulfur-Precipitating Microbial Mats at the Chefren Mud Volcano (Nile Deep Sea Fan, Eastern Mediterranean). *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3198-3215.
- Omoregie, E.O.**, Niemann, H., Mastalerz, V., de Lange, G.J., Stadnitskaia, A., Mascle, J. *et al.* (2009) Microbial methane oxidation and sulfate reduction at cold seeps of the deep Eastern Mediterranean Sea. *Mar. Geol.* **261**: 114-127.
- Orcutt, B.**, Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V., and Joye, S.B. (2005) Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**: 4267-4281.
- Oren, A.** (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 334-348.
- Orphan, V.J.**, Hous, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2001) Methane-Consuming Archaea Revealed by Directly Coupled Isotopic and Phylogenetic Analysis. *Science* **293**: 484-487.
- Orphan, V.J.**, House, C.H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 7663-7668.
- Orphan, V.J.**, Ussler III, W., Naehr, T.H., House, C.H., Hinrichs, K.-U., and Paull, C.K. (2004) Geological, geochemical, and microbiological heterogeneity of the seafloor around methane vents in the Eel River Basin, offshore California. *Chem. Geol.* **205**: 265-289.

P

Park, S.-J., Park, B.-J., and Rhee, S.-K. (2008) Comparative analysis of archaeal 16S rRNA and amoA genes to estimate the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in marine sediments. *Extremophiles* **12**: 605-615.

Parkes, R.J., Cragg, B.A., Bale, S.J., Getliff, J.M., Goodman, K., Rochelle, P.A. *et al.* (1994) Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature* **371**: 410-413.

Parkes, R.J., Cragg, B.A., and Wellsbury, P. (2000) Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeol. J.* **8**: 11-28.

Parkes, R.J., Cragg, B.A., Banning, N., Brock, F., Webster, G., Fry, J.C. *et al.* (2007) Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ. Microbiol.* **9**: 1146-1161.

Paull, C.K., Hecker, B., Commeau, R., Freeman-Lynde, R.P., Neumann, C., Corso, W.P. *et al.* (1984) Biological Communities at the Florida Escarpment Resemble Hydrothermal Vent Taxa. *Science* **226**: 965 - 967.

Pouliot, J., Galand, P.E., Lovejoy, C., and Vincent, W.F. (2009) Vertical structure of archaeal communities and the distribution of ammonia monooxygenase A gene variants in two meromictic High Arctic lakes. *Environ. Microbiol.* **11**: 687-699.

R

Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F.W., Rijpstra, I.C. *et al.*

- (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**: 918- 921.
- Reed, D.W.**, Fujita, Y., Delwiche, M.E., Blackwelder, D.B., Sheridan, P.P., Uchida, T., and Colwell, F.S. (2002) Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3759-3770.
- Reeve, J.N.**, Nölling, J., Morgan, R.M., and Smith, D.R. (1997) Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first ? *J. Bacteriol.* **179**: 5975-5986.
- Ritchie, D.A.**, Edwards, C., McDonald, I.R., and Murell, J.C. (1997) Detection of methanogens and methanotrophs in natural environments. *Glob. Chang. Biol.* **3**: 339-350.
- Rochelle, P.A.**, Cragg, B.A., Fry, J.C., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (1994) Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 215 - 225.
- Rodhe, H.** (1990) A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science* **248**: 1217-1219.
- Rudolph, C.**, Moissl, C., Henneberger, R., and Huber, R. (2004) Ecology and microbial structures of archaeal/bacterial strings-of-pearls communities and archaeal relatives thriving in cold sulfidic springs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**: 1-11.
- Rusanov, I.I.**, Yu Lein, A., Pimenov, N.V., Yusupov, S.K., and Ivanov, M.V. (2002) The biogeochemical cycle of methane on the Northwestern shelf of the Black Sea. *Microbiology* **71**: 558-566.
- S**
- Sahling, H.**, Rickert, D., Lee, R.W., Linke, P., and Suess, E. (2002) Macrofaunal community structure and sulfide flux at gas hydrate deposits from the Cascadia convergent margin, NE Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **231**: 121-138.
- Sassen, R.**, MacDonald, I.R., Norman L. Guinasso, J., Joye, S., Requejo, A.G., Sweet, S.T. *et al.* (1998) Bacterial methane oxidation in sea-floor gas hydrate: Significance to life in extreme environments. *Geology* **26**: 851–854.
- Santos, H.**, Fareleira, P., Xavier A.V., Chen L., Liu M.Y. and LeGall J. (1993) Aerobic metabolism of carbon reserves by the "obligate anaerobe" *Desulfovibrio gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **195**:551-557.
- Schleper, C.**, Jurgens, G., and Jonuscheit, M. (2005) Genomic studies of uncultivated Archaea. *Nat. Rev.* **3**: 479-488.
- Schönheit, M.**, and Schäfer, T. (1995) Metabolism of hyperthermophiles. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 26-57.
- 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.
- Schrum, H.N.**, Spivack, A.J., Kastner, M., and D'Hondt, S. (2009) Sulfate-reducing ammonium oxidation: A thermodynamically feasible metabolic pathway in subseafloor sediment. *Geology* **37**: 939-942.
- Seifert, R.**, Nauhaus, K., Blumenberg, M., Krüger, M., and Michaelis, W. (2006) Methane dynamics in a microbial community of the Black Sea traced by stable carbon isotopes in vitro. *Org. Geochem.* **37**: 1411-1419.
- Sheppard, S.K.**, McCarthy, A.J., Loughnane, J.P., Gray, N.D., Head, I.M., and Llyod, D. (2005) The impact of sludge amendment on methanogen community structure in an upland soil. *Appl. Soil Ecol.* **28**: 147-162.
- Shlimon, A.G.**, Friedrich, M.W., Niemann, H., Ramsing, N.B., and Finster, K. (2004) *Methanobacterium aarhusense* sp nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 759-763.
- Shock, E.L.** (1997) High-temperature life without photosynthesis as a model for Mars. *J.*

- Geophys. Res.* **23**: 687–694.
- Siegler, W.V.**, Miniaci, C., and Zeyer, J. (2004) Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *J. Microbiol. Methods* **57**: 17-22.
- Singh, N.**, Kendall, M.M., Liu, Y., and Boone, D.R. (2005) Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococcoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosacina baltica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2531-2538.
- Skyring, G.W.** (1987) Sulfate reduction in coastal ecosystems. *Geomicrobiol. J.* **5**:295-374.
- Smith, J.S.**, Gree, S.J., Kelley, C.A., Prufert-Bebout, L., and Bebout, B.M. (2008) Shifts in methanogen community structure and function associated with long-term manipulation of sulfate and salinity in a hypersaline microbial mat. *Environ. Microbiol.* **10**: 386-394.
- Smith, K.S.**, and Ingram-Smith, C. (2007) Methanosaeta, the forgotten methanogen ? *Trends Microbiol.* **15**: 150-155.
- Sørensen, K.B.**, Canfield, D.E., Teske, A.P., and Oren, A. (2005) Community Composition of a Hypersaline Endoevaporitic Microbial Mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7352–7365.
- Sørensen, K.B.**, and Teske, A. (2006) Stratified communities of active Archaea in deep marine subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4596-4603.
- Sowers, K.R.**, and Ferry, J.G. (1983) Isolation and characterization of a methylotrophic marine methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 684-690.
- Sowers, K.R.**, Baron, S.F., and Ferry, J.G. (1984) *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetoclastic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 971-978.
- Stein, L.Y.**, Jones, G., Alexander, B., Elmund, K., Wright-Jones, C., and Nealson, K.H. (2002) Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 431-440.
- Suess, E.**, Ritger, S.D., Moore, J.C., Jones, M.L., Kulm, L.D., and Cochrane, G.R. (1985) Biological communities at vent sites along the subduction zone off Oregon. *Biol. Soc. Wash. Bull.* **6**: 475-484.
- Suzuki, M.**, and Giovannoni, S.J. (1996) Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 625–630.
- ## T
- Takai, K.**, and Horikoshi, K. (1999) Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments. *Genetics* **152**: 1285-1297.
- Takai, K.**, Moser, D.P., DeFlaun, M., Onstott, T.C., and Frederickson, J.K. (2001) Archaeal Diversity in Waters from Deep South African Gold Mines. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5750-5760.
- Takai, K.**, Oida, H., Suzuki, Y., Hirayama, H., Nakagawa, S., Nunoura, T. *et al.* (2004) Spatial Distribution of Marine Crenarchaeota Group I in the Vicinity of Deep-Sea Hydrothermal Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2404-2413.
- Teske, A.**, Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A.D., 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.
- Teske, A.**, and Sorensen, K.B. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all ? *ISME J* **2**: 3-18.
- Thauer, R.K.** (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.

- Thomsen, T.R.**, Finster, K., and Ramsing, N.B. (2001) Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1646-1656.
- Treude, T.**, Boetius, A., Knittel, K., Wallmann, K., and Jørgensen, B.B. (2003) Anaerobic oxidation of methane above gas hydrates at Hydrate Ridge, NE Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **264**: 1-14.
- Treude, T.**, Orphan, V., Knittel, K., Gieseke, A., House, C.H., and Boetius, A. (2007) Consumption of methane and CO₂ by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2271-2283.
- V**
- Valentine, D.L.** (2002) Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 271-282.
- Vetriani, C.**, Jannasch, H.W., J, M.B., Stahl, D.A., and Reysenbach, A.-L. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4375-4384.
- Vetriani, C.**, Tran, H.V., and Kerkhof, L.J. (2003) Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxidic/Anoxic Chemocline of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6481-6488.
- Von Klein, D.**, Arab, H., Völker, H., and Thomm, M. (2002) *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic sea. *Extremophiles* **6**: 103-110.
- W**
- Webster, G.**, Parkes, R.J., Cragg, B.A., Newberry, C.J., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2006) Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 65-85.
- Wegener, G.**, Shovitri, M., Knittel, K., Niemann, H., Hovland, M., and Boetius, A. (2008) Biogeochemical processes and microbial diversity of the Gullfaks and Tommeliten methane seeps (Northern North Sea). *Biogeosciences* **5**: 1127-1144.
- Wellsbury, P.**, Goodman, K., Barth, T., Cragg, B.A., Barnes, S.P., and Parkes, R.J. (1997) Deepmarine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nat. Geosci.* **388**: 573-576.
- Whitman, W.B.**, Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6578-6583.
- Widdel, F.**, and Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 259-276.
- Wilms, R.**, Sass, H., Köpke, B., Köster, J., Cypionka, H., and Engelen, B. (2006) Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2756-2764.
- Wilms, R.**, Sass, H., Köpke, B., Cypionka, H., and Engelen, B. (2007) Methane and sulfate profiles within the subsurface of a tidal flat are reflected by the distribution of sulfate-reducing bacteria and methanogenic Archaea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 611-621.
- Y**
- Yakimov, M.M.**, La Cono, V., Denaro, R., D'Auria, G., Decembrini, F., Timmis, K.N. et al. (2007) Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L'Atalante, Eastern Mediterranean Sea. *ISME J* **1**: 743-755.
- Yoshioka, H.**, Sakata, S., Cragg, B.A., Parkes, R.J., and Jujii, T. (2009) Microbial methane production rates in gas hydrate-bearing sediments from the eastern Nankai Trough, off central Japan. *Geochem. J.* **43**: 315-321.
- Z**
- Zverlov, V.**, Klein, M., Lücker, S., Friedrich, M.W., Kellermann, J., Stahl, D.A. et al. (2005) Lateral Gene Transfer of Dissimilatory (Bi)Sulfite Reductase Revisited. *J. Bacteriol.* **187**: 2203-2208.

ANNEXES

I - ECHANTILLONNAGE

L'observation des cartes bathymétriques et suivi des vidéos relevées par le robot VICTOR 6000 ont permis de sélectionner les zones à échantillonner, pendant des plongées de "reconnaissance".

Les sédiments ont ensuite été prélevés à l'aide de différents outils adaptés (Figure 32):

- carottier tube (longueur 500 mm et diamètre intérieur 53 mm) ou carottier lame, manipulés par le bras mécanique du VICTOR 6000,
- carottier gravitaires type Kullenberg, qui sont des carottes métalliques plus longues (de 3 à 10m), déployées à partir du navire; le sédiment est récupéré dans un tube PVC à l'intérieur du carottier métallique.

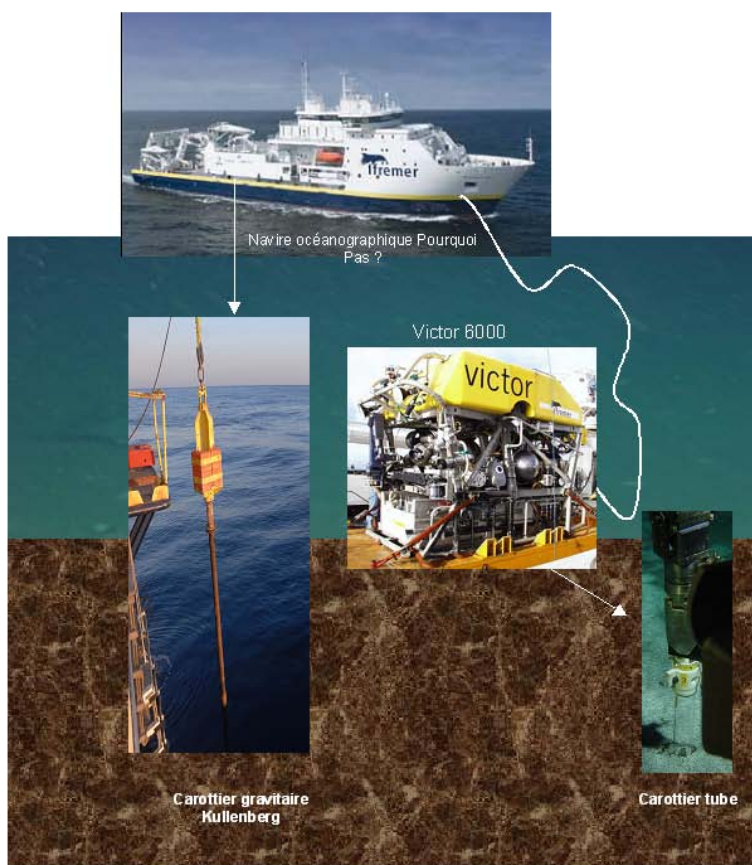




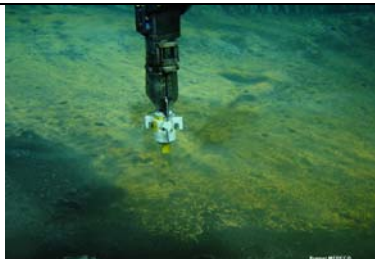


Figure 32: Schéma représentant les différents outils utilisés pour récolter les échantillons de sédiment lors des campagnes océanographiques.

Le tableau 6 regroupe les photos des différents échantillons de sédiment utilisés dans le cadre de cette thèse, récupérés lors des deux campagnes VICKING et MEDECO, à l'exception des échantillons du volcan de boue Amsterdam.

Campagne	Code de l'échantillon	Brève description	Photo de la zone échantillonnée
VICKING	CT-16	Zone tapis bactériens, HMMV	
	CT-9	Zone peuplée par des vers tubicoles, Storegga	
	CT-22	Zone de tapis microbiens du pockmark G11, Nyegga	

Campagne	Code de l'échantillon	Brève description	Photo de la zone échantillonnée
MEDECO Partie 1	MED-KUL 4	Zone centrale, Napoli	
	CT-21	Tapis microbien orange, Napoli	



MEDECO Partie 2	PC-5	Sédiment gris, site 2B pockmarks	
	PC-3	Sédiment gris, site 2A pockmarks	

Tableau 6: Liste des échantillons récoltés lors des campagnes VICKING et MEDECO. CT ou PC (Push Core): carottier tube, et KUL: carottier gravitaire Kullenberg.

II – ETUDE COMPLEMENTAIRE: LA PCR-DGGE BASEE SUR LE GENE FONCTIONNEL *mcrA*

La technique de PCR-DGGE a pour avantage de pouvoir analyser simultanément plusieurs échantillons; dans notre cas plusieurs sections de profondeur de sédiment pour un carottier tube, ou gravitaire Kullenberg. Un des objectifs de cette thèse était d'identifier les acteurs microbiens liés au cycle du méthane, dont principalement les *Archaea* méthanotrophes anaérobies et méthanogènes porteurs du gène *mcrA*. Il semblait donc intéressant d'utiliser la technique de PCR-DGGE basée sur le gène fonctionnel *mcrA* pour étudier leur diversité sur toute la longueur des échantillons de sédiments récoltés. Cette vision d'ensemble de la structure des communautés *Archaea* méthanotrophes anaérobies/méthanogènes selon la profondeur de sédiment aurait été fastidieuse voire impossible à obtenir en utilisant la technique de clonage des gènes *mcrA*. Nous nous sommes basés sur des études antérieures pour tenter d'optimiser la méthode de PCR-DGGE à partir du gène fonctionnel *mcrA* (Sheppard *et al.*, 2005; Wilms *et al.*, 2007).

II-1 – Amplifications par PCR des gènes fonctionnels *mcrA*

Les ADN extraits de la carotte CT-16 (zone de tapis microbiens du volcan de boue Haakon Mosby en Mer de Norvège) ont été utilisés comme marqueurs, afin de pouvoir comparer les profils DGGE.

Afin d'amplifier les gènes *mcrA*, plusieurs conditions de PCR ont été testées. Les amorces ME1 (5'-GCMATGCARATHGGWATGTC-3') et ME2 (5'-TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT-3') ont été utilisées dans une première réaction (Hales *et al.*, 1996). Le cycle consiste en 40 secondes de dénaturation à 94°C, 1 minute 30 secondes d'hybridation à 50°C et 3 minutes d'élongation à 72 °C, le cycle est répété 30 fois. Les amplifiats obtenus ont ensuite été utilisés lors d'une deuxième PCR nichée utilisant les amorces *mcrA*-F-GC (5'-GGTGGTGTMGATTACACARTAYGCWACAGC-3') et *mcrA*-R (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3') (Luton *et al.*, 2002), avec l'amorce sens *mcrA*-F-GC qui comprend une queue GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG-3'). Le cycle

d'amplification PCR consiste en 45 secondes de dénaturation à 95°C, 45 secondes d'hybridation à 54°C et 2 minutes d'élongation à 72 °C. Le cycle est répété 30 fois. Nous avons tenté d'amplifier directement l'ADN matrice avec les amorces *mcrA-F-GC* et *mcrA-R*, afin d'éviter des biais moléculaires supplémentaires, mais les amplifications étaient de trop faible intensité pour être chargés sur nos gels électrophorétiques de DGGE.

II-2 – Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE)

Les migrations électrophorétiques de DGGE ont été initialement testés en utilisant un gradient de dénaturation de 20%-80%. Les produits PCR obtenus à partir d'extraits d'ADN de cultures pures de méthanogènes : *Methanoculleus submarinus*, *Methanococcoides alaskense*, et un isolat de la carotte CT-16 ont été utilisés comme marqueurs témoin. D'autre part des produits PCR amplifiés à partir d'ADN extraits du sédiment de la carotte CT-16 ont été utilisés (Figure 33).

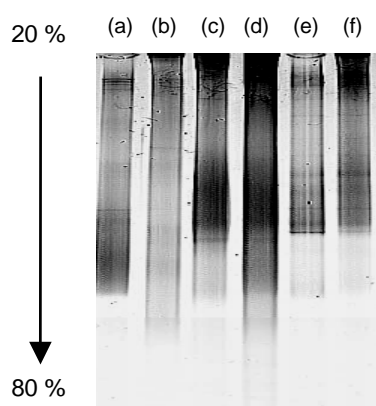


Figure 33: Gel DGGE (gradient de dénaturation 20%-80%), de produits PCR *mcrA* obtenus à partir de matrices ADN extraits du sédiment CT-16, et de cultures pures de méthanogènes. (a) *Methanoculleus submarinus*, (b) *Methanococcoides alaskense*, (c) isolat CT-16, (d) mélange des produits PCR des 3 cultures pures, (e) échantillon environnemental carotte CT-16 section 2-4 cm et (f) échantillon environnemental carotte CT-16 section 8-10 cm.

Les conditions de migration étaient de 70 V pendant 16 heures (Wilms *et al.*, 2007). L'observation du gel a révélé la présence de bandes pour chaque section de 2 cm. Cependant, la présence d'un intense bruit de fond et des bandes trop faibles en intensité n'ont pas permis d'exploiter ce gel et d'en extraire des bandes d'intérêts en vue de leur identification par séquençage.

Siegler *et al.* (2004) ont montré que le temps de migration avait un impact sur les profils obtenus en analyse DGGE. Ceci est probablement dû à une instabilité du gradient de dénaturation. Les résultats indiquent qu'une augmentation du temps de migration électrophorétique modifie les profils. Les auteurs montrent que le temps de

migration optimal sont de 5 heures à 200 volts ou 10 heures à 100 volts (ils n'observent pas de différence entre ces deux temps de migration). Afin d'optimiser les migrations électrophorétiques, ces deux conditions ont donc été testées, à partir des mêmes produits PCR. Une première observation des gels indique un temps de migration optimal de 5 heures à 200 volts (Figure 34). Ces conditions ont donc été appliquées pour les analyses ultérieures. Cependant, l'observation d'un bruit de fond, et une intensité des bandes trop faibles n'a pas permis de les exciser.

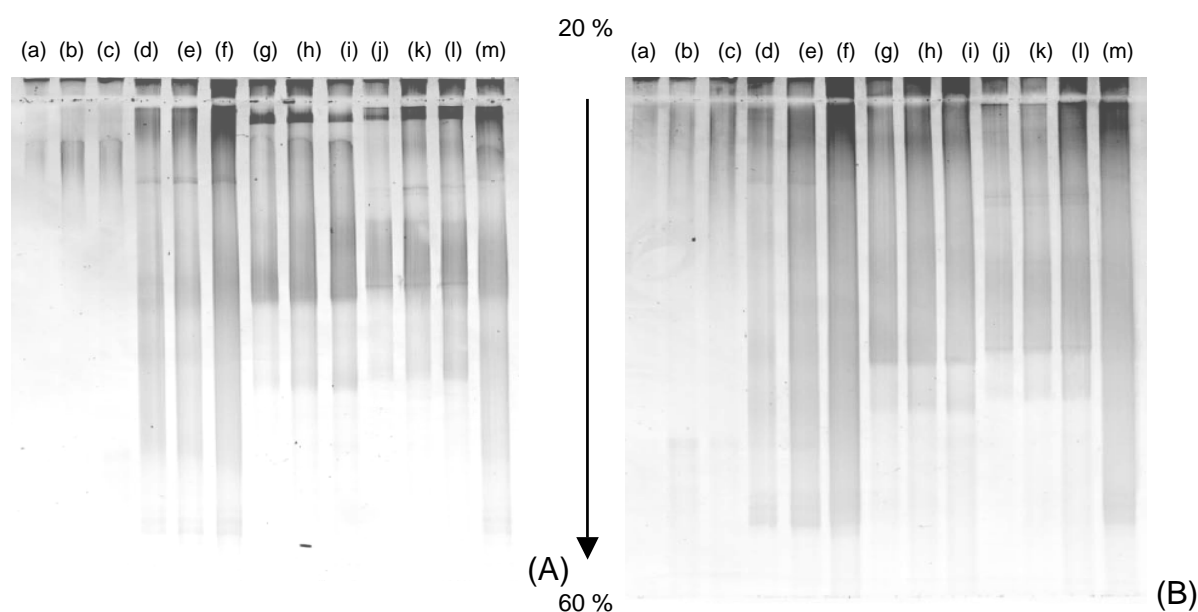


Figure 34: Gels DGGE (gradient de dénaturation 20%-60%), de produits PCR *mcrA* obtenus à partir de matrices ADN extraites du sédiment CT-16, et de cultures pures. (a) *Methanoculleus submarinus* 5 µL, (b) *M. submarinus* 10 µL, (c) *M. submarinus* 15 µL, (d) *Methanococcoides alaskense* 5 µL, (e) *M. alaskense* 10 µL, (f) *M. alaskense* 15 µL, (g) isolat CT-16 5 µL, (h) isolat CT-16 10 µL, (i) isolat CT-16 15 µL, (j) échantillon environnemental carotte CT-16 section 2-4 cm, 5 µL, (k) échantillon environnemental carotte CT-16 section 2-4 cm, 10 µL, (l) échantillon environnemental carotte CT-16 section 2-4 cm, 15 µL et (m) mélange des produits PCR des 3 cultures pures (5 µL). (A) migration à 200 V pendant 5 heures et (B) migration à 100 V pendant 10 heures.

Nous avons alors formulé l'hypothèse que les problèmes rencontrés pouvaient provenir du pourcentage en GC contenu dans le fragment du gène *mcrA* analysé. En effet, il a été montré que la technique de DGGE était plus résolutive pour des fragments d'ADN contenant un haut pourcentage en GC (> 55%), alors que la technique de TGGE (Temporal Gradient Gel Electrophoresis) semblait plus résolutive pour des fragments avec des bas pourcentages en GC (< 55 %) (Lafarge *et al.*, 2004; Ogier *et al.*, 2004). Or le fragment du gène *mcrA* analysé a un contenu en GC % de l'ordre de 54 %. La technique de TGGE basée sur le gène *mcrA* a donc été testée.

II-3 – Temporal Gradient Gel Electrophoresis (TGGE)

La technique de TGGE permet la séparation des fragments selon un gradient de dénaturation thermique. Elle repose en effet sur une séparation des fragments d'ADN selon un gradient de température. Les produits PCR déposés sont aussi des produits amplifiés avec des amorces GC clamp, et le gel d'acrylamide 8 % contient 8M d'urée. Pour une séparation des produits d'amplifications du gène *mcrA*, le gradient théorique de température calculé est de 59 °C à 69 °C. Le gradient a été testé avec une incrémentation de 1 °C/heure ou 0,5 °C/heure afin de vérifier si cette incrémentation a un effet sur la résolution des bandes (Figure 35).

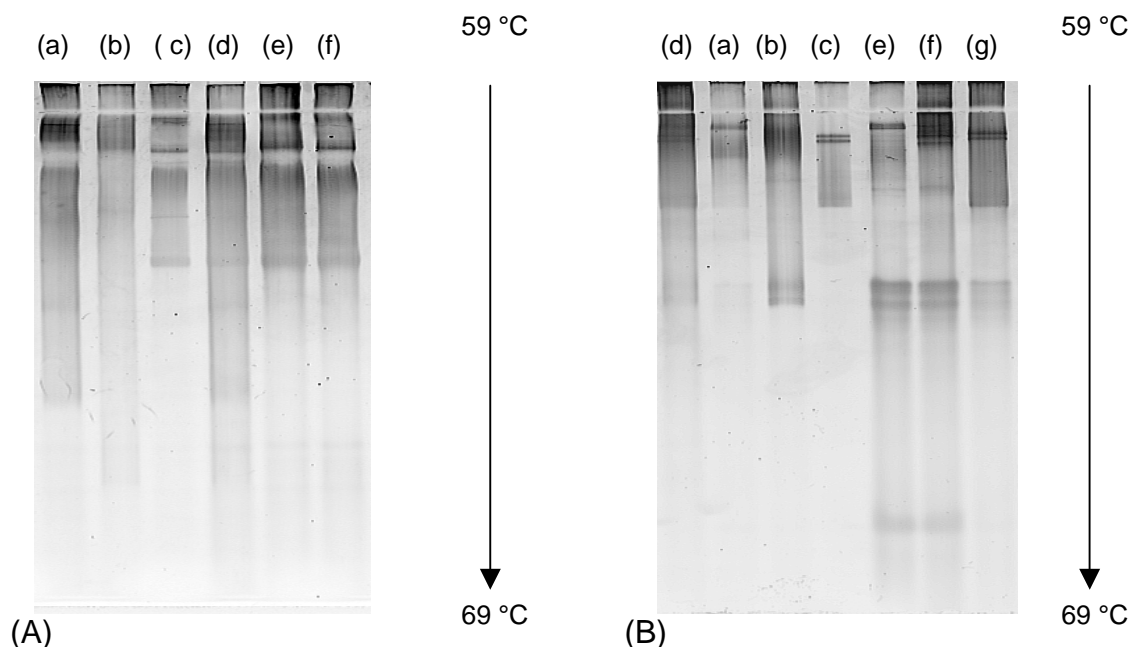


Figure 35: Gels TGGE (gradient de dénaturation 59°C à 69°C) de produits PCR *mcrA* obtenus à partir de matrices ADN extraites du sédiment CT-16, et de cultures pures. (a) *Methanoculleus submarinus*, (b) *Methanococcoides alaskense*, (c) isolat CT-16, (d) mélange des produits PCR des 3 cultures pures, (e) échantillon environnemental carotte CT-16 section 2-4 cm, (f) échantillon environnemental carotte CT-16 section 4-6 cm, (g) échantillon environnemental carotte CT-16 section 6-8 cm. (A) migration avec une incrémentation de 0,5°C/heure et (B) migration avec une incrémentation de 1°C/heure.

Encore une fois, les gels montrent des bandes d'intensité trop faibles pour pouvoir être excisées.

En raison des limites connues de la technique de DGGE, nous avons alors formulé une autre hypothèse, à savoir que la longueur du fragment PCR (environ 500 pb) pouvait être responsable de la qualité décevante des gels obtenus. Nous

avons donc entrepris de dessiner de nouvelles amorces pour amplifier un fragment du gène *mcrA* plus court.

II-4 – Test d'amorces *mcrA in silico*

Nous avons donc cherché à faire migrer des fragments plus petits que 467 pb afin d'augmenter la qualité des profils observés. Pour cela, comme il n'existe pas de couple d'amorces ciblant un fragment plus petit du gène *mcrA* dans la littérature, nous avons construit un nouveau couple d'amorces. Des séquences protéiques du MCR (GenBank) de 12 espèces de méthanogènes (3 de chaque ordre: *Methanosarcinales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales* et *Methanomicrobiales*) ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalX (Chenna *et al.*, 2003). A partir de cet alignement une séquence protéique consensus a été définie, ciblant une zone conservée de la protéine (Tableau 7).

<i>Methanosarcina mazei</i>	FGGSQRATVLA AAAAGVACALGTANANAGLSGWYLSMYLHKEAWGR LGFFGF
<i>Methanosarcina barkeri</i>	FGGSQRATVLA AAAAGVACSLATGNANAGLSGWYLSMYLHKEAWGR LGFFGF
<i>Methanosaeta concilii</i>	FGGSQRAAVLAAAAGITSATGHSQIGLAGWYLSMLLHKEAWGR LGFFGY
<i>Methanocorpusculum parvum</i>	FGGSQRAAVLAAAAGISTSIATGNSNAGLNGWYLSMLLHKDWSR LGFFGY
<i>Methanoculleus sp.</i>	FGGSQRAGVLA AAAAGLSASITGNSNAGLNWYLCMLLHKDWSR LGFFGY
<i>Methanospirillum hungatei</i>	FGGSQRAGVIA AAAAGLSVGVATANSNAGLNGWYLSMLMHKEGWSR LGFFGY
<i>Methanobacterium sp.</i>	FGGSQRASIVAAAAGCSTAFATGNAQTGLSGWYLSMYLHKEQHSR LGFFGY
<i>Methanobacterium bryantii</i>	FGGSQRAAVTAAAAGCSTAFATGNAQTGLSGWYLSMYLHKEQHSR LGFFGY
<i>Methanobacterium aarhusense</i>	FGGSQRAAVAAAAACSTGFATGNAQTALSGWYLSMYLHKEQHSR LGFFGY
<i>Methanococcus aeolicus</i>	FGGSQRAAVAAAAAGVSVCMATGNSNAGVNGWYLSQIMHKEYHSR LGFFGY
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	FGGSQRAAVAAAAAGISVCMATGNSNAGVNGWYLSQIMHKEYHSR LGFFGY
<i>Methanotorris igneus</i>	FGGSQRAAVTAAAAGIT TALATGNSNAGLNGWYLSQILHKEYHSR LGFFGY
<i>Methanopyrus kandleri</i>	FGGSQRAAVCA AAAAGCSTAFATGHAQAGLNGWYLSQILHKEGHGR LGFFGY

Tableau 7: Alignement obtenu à partir des séquences protéiques du MCR encadrées par la séquence consensus choisie (en bleu en 5' et rouge en 3').

Cet alignement a servi de base pour construire un arbre phylogénétique (Figure 36) selon la méthode de distance neighbour joining, à l'aide du logiciel MEGA3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

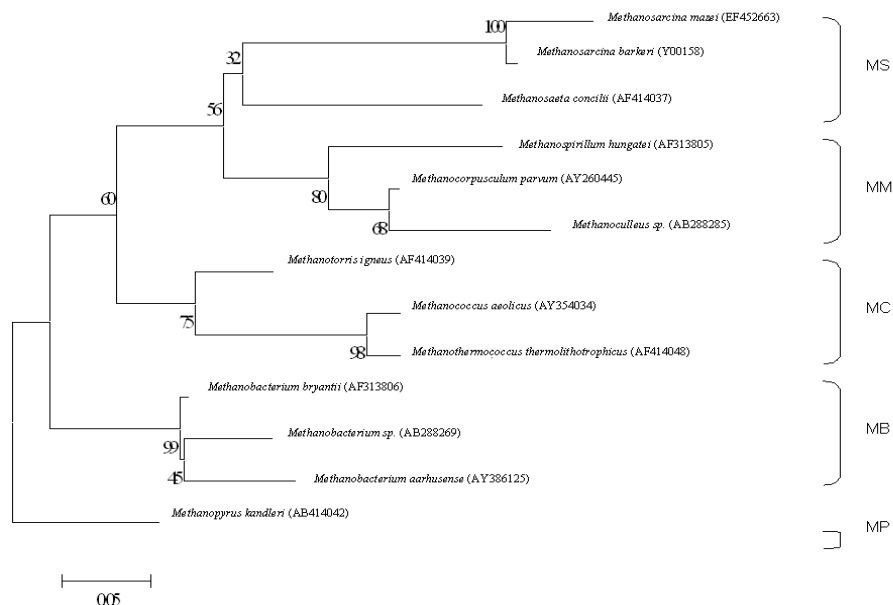


Figure 36: Arbre phylogénétique construit à partir d'alignements de séquences protéiques d'une séquence consensus du MCR, selon la méthode de distance neighbour joining avec le logiciel MEGA4. *Methanopyrus kandleri* est utilisé comme groupe externe pour raciner l'arbre. Les valeurs de bootstrap pour 100 essais, calculés selon la méthode de maximum de parsimonie sont montrés au niveau des nœuds. Les numéros d'accessions des séquences sont indiqués entre parenthèses. MS: *Methanosarcinales*, MM: *Methanomicrobiales*, MC: *Methanococcales*, MB: *Methanobacterales* et MP: *Methanopyrales*.

La topologie de cet arbre était comparable aux topologies d'arbres obtenus par l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S. Ce fragment du gène *mcrA* semblait donc être un bon marqueur pour cibler les méthanogènes.

Un alignement des séquences de nucléotides a ensuite été effectué pour dessiner les amorces. Ces amorces ont été nommées MA-F (5' TTYGGWGGWTCMCARCGDGCA 3') et MA-R (5' CTGCARRTCRTASCCGSA 3'). La position du fragment recherché à l'aide de ces amorces, par rapport au fragment amplifié par les couple d'amorces ME1/ME2 et *mcrA*-F/*mcrA*-R est représenté Figure 37.

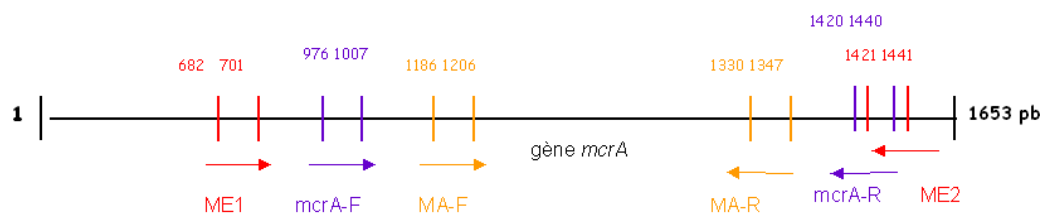


Figure 37: Positionnement des différentes paires d'amorces ciblant des fragments du gène *mcrA*, par rapport au gène *mcrA*. Positionnement des paire d'amorces ME1/ME2 d'après Hales *et al.* (1996), paire d'amorces *mcrA*-F/*mcrA*-R d'après Luton *et al.* (2002) et MA-F/MA-R d'après cette étude.

La taille du fragment recherché avec le nouveau couple d'amorces MA-F/MA-R était de 162 pb. Un test *in silico*, utilisant le logiciel OligoCheck_1.0 (Emrich *et al.*, 2003) a été effectué, en incluant des mésappariements entre les amorces et des séquences du gène *mcrA* inférieurs à 2 ou à 3. En effet Banning *et al.* (2005) se basent sur l'hypothèse qu'un mésappariement ≤ 3 permet une amplification PCR. Dans ce but, une banque de données de 521 séquences partielles ou totales du gène *mcrA* a été créée. Ces séquences proviennent de méthanogènes incultivés et cultivés. Ces tests *in silico* ont indiqué des pourcentages de couverture de la banque de gènes *mcrA* à l'aide des amorces nouvellement dessinées de 87,5 à 100 % (Tableau 8).

	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanococcales</i>
MA-F	100 %	93 %	100 %	100 %
	86,3 %	80 %	87,5 %	60 %
MA-R	100 %	93 %	87,5 %	100 %
	100 %	93 %	62,5 %	70 %

Tableau 8: Analyse OligoCheck des amorces MA-F/MA-R montrant les pourcentages de couverture de banques pour les 4 ordres connus de méthanogènes.

Mésappariement amorces-séquence cible ≤ 2 .

Mésappariement amorces-séquence cible ≤ 3 .

La température optimale d'hybridation du nouveau couple d'amorce a ensuite été recherchée en testant un gradient de température allant de 55 °C à 60°C. Cependant les tests d'amplification avec des gradients de température, sur des ADN extraits de cultures pures de méthanogènes (*Methanoculleus submarinus* et *Methanococcoides alaskense*) n'ont pas permis d'amplifier le fragment de taille attendue (162 pb). Il est possible que les amorces aient été trop dégénérées et qu'elles se soient fixées de façon aléatoire et non spécifique sur l'ADN matrice.

II-5 – Test d'amorces marquées avec un fluorochrome

Il était aussi possible que le problème dans la qualité des gels provenait de la technique de révélation des gels. Pour tous les tests décrits précédemment, nous avons coloré les gels avec du SYBR Gold, et visualisé à l'aide du scanner Typhoon 9400 Variable Mode Imager, avec une longueur d'onde d'excitation à 488 nm et une

longueur d'onde d'émission à 520 nm. Nous avons donc décidé de tester un couple d'amorces *mcrA*-F-GC/*mcrA*-R*, dont le *mcrA*-R* était marqué en 5' avec le fluorochrome Cy3 (indocarbocyanine), pour amplifier les gènes *mcrA*. La longueur d'onde d'émission utilisée a été 523 nm, et la longueur d'onde d'émission 580 nm. Le résultat (Figure 38), indique un gel DGGE assez résolutif pour séparer les bandes.

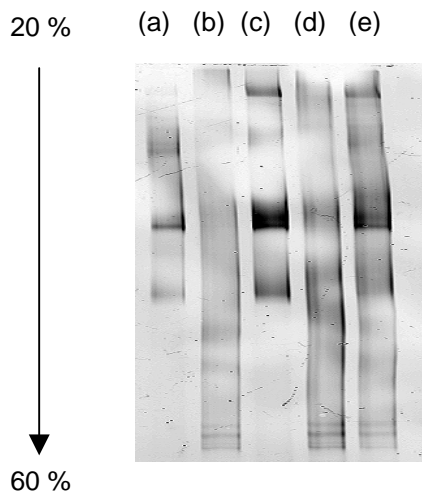


Figure 38: Gel DGGE avec un gradient de dénaturation 20%-60%, de produits PCR *mcrA*, utilisant un couple d'amorces marquées, obtenus à partir de matrices ADN de cultures pures de méthanogènes. (a) *Methanoculleus submarinus* 5 μ L, (b) *M. submarinus* 10 μ L, (c) *Methanococcoides alaskense* 5 μ L, (d) *M. alaskense* 10 μ L, (e) mélange des produits PCR des 2 cultures pures.

II-6 - Conclusion

D'autres alternatives proposées dans la littérature n'ont pas pu être testées. La première repose sur l'utilisation d'amorces *Archaea* 16S qui ciblent spécifiquement les *Archaea* méthanotrophes anaérobies et méthanogènes. Cheng *et al.* (2009) ont montré par exemple que les amorces 519f/915rGC étaient plus adaptées à la détection de méthanogènes utilisant la technique de DGGE et permettent l'obtention de gels plus résolutifs. D'autre part, Banning *et al.* (2005) ont dessiné trois couples d'amorces ciblant les gènes ARNr 16S des ordres *Methanomicrobiales*/*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* et *Methanococcales*. Et, Miyashita *et al.* (2009) ont publié des couples d'amorces ciblant les gènes 16S ARNr de chaque groupe de méthanotrophes (ANME-1, ANME-2a, ANME-2b, ANME-2c, et ANME-3). Toutefois l'information apportée par l'étude du gène 16S ARNr ne renseigne pas sur le rôle des organismes portant ce gène dans l'écosystème. Dans une étude de PCR quantitative, Colwell *et al.* (2008) ont mis au point un couple d'amorces amplifiant une fraction de 287 pb du gène *mcrA*. Ce couple d'amorce pourrait être utilisé pour amplifier les gènes *mcrA*, en vue d'une analyse de la diversité en DGGE.

DIVERSITE ET ACTIVITE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS DES SEDIMENTS MARINS ASSOCIES AUX EMISSIONS DE FLUIDES FROIDS

RESUME

La majorité du méthane, gaz à effet de serre, est stocké dans les sédiments marins. Or seule une faible proportion de ce méthane atteint l'hydrosphère et l'atmosphère, parce qu'il est consommé par un biofiltre efficace constitué d'*Archaea* anaérobies qui oxydent le méthane (ANME). Ce méthane a une origine principalement biogénique dans les sédiments marins, car il est synthétisé par des *Archaea* méthanogènes dans des sources profondes, et migre dans des zones spécifiques d'émissions de fluides froids des marges continentales.

Dans le but d'étudier la diversité des communautés microbiennes associées à ces émissions de fluides froids, et de déterminer les facteurs géochimiques contrôlant la distribution de ces communautés microbiennes, quatre sites d'un point de vue géochimique et géologique ont été comparés. Dans le cadre de cette étude, des outils de biologie moléculaire (PCR, RT-PCR, DGGE, clonage) et des marqueurs génétiques (ARNr 16S, *mcrA*, *dsrB*) ont été employés, afin de contourner les limites des approches culturelles.

Ce travail de recherche a permis: (i) de déterminer la structure et la diversité des communautés *Archaea* dans des sédiments soumis à des migrations de fluides froids, (ii) de mettre en évidence des communautés méthanogènes actives, (iii) d'observer une dominance des séquences affiliées aux ANME, et (iv) d'identifier des *Archaea* métaboliquement actives appartenant à des lignées d'*Archaea* incultivées. Ainsi, cette étude a permis d'élargir nos connaissances de diversité des *Archaea* présentes dans les sédiments de zones d'émissions de fluides froids des marges continentales.

MOTS CLES

Diversité moléculaire, *Archaea*, méthanogène, ANME, *mcrA*, *dsrB*, DGGE, volcan de boue, pockmark, saumures, fluides froids, méthane, Mer de Norvège, Mer Méditerranée, sédiments.

DIVERSITY AND ACTIVITY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN COLD SEEP SEDIMENTS

SUMMARY

A large portion of the greenhouse gas methane on Earth is trapped in marine sediments. However, little methane actually reaches the hydrosphere and the atmosphere, because it is efficiently consumed by anaerobic methane-oxidizing *Archaea* (ANME). This methane is mainly biogenic in marine sediments, and is produced by methanogenic *Archaea*. Methane ascends from deep sources to the seabed, in cold seep sites of continental margins.

In order to study microbial community diversity in cold seeps, and to determine geochemical factors that control these microbial communities, we compared four geochemically and geologically distinct sites. In this work, molecular tools (PCR, RT-PCR, DGGE, cloning) as well as genetic markers (16S rRNA, *mcrA*, *dsrB*) were employed, to circumvent the limits related to cultural methods.

This research allowed: (i) to determine structure and diversity of archaeal communities in cold seep sediments, (ii) to highlight an active methanogenic community, (iii) the dominance of ANME affiliated sequences, and (iv) to identify metabolically active *Archaea* belonging to uncultured archaeal groups. Hence this work broadened our view on the diversity of archaeal communities in cold seep sediments of continental margins.

KEY WORDS

Molecular diversity, *Archaea*, methanogen, ANME, *mcrA*, *dsrB*, DGGE, mud volcano, pockmark, brines, cold seep, methane, Norwegian Sea, Mediterranean Sea, sediments.