

UNIVERSITE DE PROVENCE (AIX-MARSEILLE I)

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PROVENCE (AIX-MARSEILLE I)

en Microbiologie, Biologie Végétale et Biotechnologies

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

soutenue publiquement par

Anne POSTEC

le 27 mai 2005

**Diversité de populations microbiennes thermophiles d'une
cheminée hydrothermale océanique : cultures d'enrichissement
en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles.**

Membres du jury :

Mme Chantal TARDIF, Professeur, Université de Provence (Aix-Marseille I)

Présidente

M. Bernard OLLIVIER, Directeur de recherche, IRD, Marseille

Directeur de thèse

Mme Anne GODFROY, Chercheur, Ifremer de Brest,

Responsable scientifique

M. Michel MAGOT, Professeur, Université de Pau,

Rapporteur

M. Gérard FONTY, Directeur de Recherche, CNRS, Clermont-Ferrand

Rapporteur

M. Daniel PRIEUR, Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest

Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier d'Ifremer et de la Région Bretagne.

Je remercie tout d'abord les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail de thèse, en particulier les rapporteurs Messieurs Michel Magot, Professeur, et Gérard Fonty, Directeur de Recherche. Mes remerciements s'adressent également au Professeur Chantal Tardif et au Professeur Daniel Prieur pour leur participation à ce jury de thèse. Je n'oublie pas, Daniel, les rencontres que tu m'as permises de faire, lors des congrès à Exeter et à Cancun : qu'il me soit permis de t'en remercier.

Je remercie Joël Querellou de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, et de m'avoir permis de mener ce travail jusqu'à son terme dans de bonnes conditions.

A Monsieur Bernard Ollivier, qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude, pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse et pour avoir toujours été présent dans le suivi de ce travail malgré la distance.

Ma plus profonde reconnaissance s'adresse à Anne Godfroy qui a encadré mes travaux depuis le DEA jusqu'à ce jour. Merci Anne de m'avoir permis de faire cette thèse. Merci pour ton soutien sans faille, à la paillasse comme pour la rédaction, merci pour tes encouragements, ton enthousiasme, ta bienveillance et ta disponibilité tout au long de cette thèse.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin aux résultats présentés dans cette thèse.

Je remercie vivement Laurent Urios, docteur urgentiste incroyablement disponible, pour son « assistance 24/24 ». Merci de m'avoir fait partager aussi généreusement une petite parcelle de ton immense savoir qui dépasse tellement la microbiologie, les coryphelles, Toutankhamon et Gaston.

Merci à la brillante Karine Alain, « co-galérienne », pour ses conseils avisés et amicaux, à qui je souhaite beaucoup de réussite !!

J'adresse mes très sincères remerciements aux étudiantes qui ont participé à ce travail, Aurélia Letêtu et Claire Lebreton, pour leur persévérance et leur enthousiasme.

Je remercie tout particulièrement Françoise Lesongeur pour sa collaboration si précieuse et sa sympathie de chaque jour. Merci à Patricia Pignet pour son travail de qualité en matière d'analyses HPLC, à Josiane Le Bars et Christine Lamy pour leur aide et leur bonne humeur, à Marie-Anne Cambon-Bonavita pour ses 'coups de main' en

phylogénie, à Valérie Cueff-Gauchard pour sa disponibilité et sa gentillesse. Merci Valérie de m'avoir fait connaître ce laboratoire et de m'avoir accueillie sur Brest! Une pensée également pour Erwan Corre qui m'a le premier initiée avec enthousiasme à la recherche en microbiologie des environnements extrêmes et qui m'a tant appris (en si peu de temps !). Je remercie tous les techniciens et chercheurs avec qui j'ai eu la chance de travailler, pour leur gentillesse, leur conseils techniques et nos discussions scientifiques : Georges Barbier, Nicole Devauchelle, Dominique Hervio-Hatt pour la découverte du 'monde ARN', Philippe Soudant et Dominique Mari pour la cytométrie de flux, Mathieu Garnier et Jean-Louis Nicolas pour la DGGE, Daniel Desbruyères pour la lecture de cette thèse, Marie-Laure Fardeau pour son aide en particulier dans les démarches administratives.

Je remercie les collègues de « réplication », Didier Flament, Ghislaine Henneke, Jean-Paul Raffin (pour son impertinence et ses pensées 'géniales' quotidiennes !). J'adresse un remerciement amical à Christophe Rouillon, entre autre pour nos discussions philosophico-artistico-maritimo-fantaisistes. Merci de faire partager tes talents (cuisine, photos, poésie...). Je te souhaite beaucoup de belles découvertes !

Je n'oublie pas Gérard Raguénès et les joyeux copains thésards Xavier Moppert et Anthony Courtois, les nombreux étudiants du voyage, entre autres le mélomane Sylvain D'Hautel et Erwan Roussel (merci de m'avoir sauvé de mes 'glissades de bouton'), les collègues de l'IUEM : Hélène Moussard (Viva Mexico !), Mélusine Gaillard, Christian Jeanthon, Gaël Erauso, Jean-Louis Birrien et toute l'équipe.

Pour leur intérêt pour ce travail et leur présence précieuse, je remercie encore : ma chère Béra et Benjamin (ah !! les joies de la mer !), Hélène, les deux acolytes Loïc et Laurent et leur joyeuse bande, Coco, les anciens IUTiens quimpérois et Magistériens nancéiens...

Merci à toute ma famille qui m'a toujours soutenue, Isabelle, François et les autres. Clin d'œil particulier à ma chère Emilie et sa petite famille.

A mon père, à qui je dois mes encouragements les plus chaleureux et les plus précieux, merci d'avoir toujours eu confiance, et de m'accompagner aussi affectueusement. Je te dédie cette thèse.

A ma mère.

La rade, le goulet, le large, la mer, à tous ceux qui l'aiment, à ceux qui ont su me faire partager leur passion. Merci de m'avoir donné mes plus beaux rêves.

Table des Matières

<u>ABREVIATIONS</u>	<u>9</u>
<u>LISTE DES ILLUSTRATIONS</u>	<u>11</u>
<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	<u>15</u>
<u>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</u>	<u>17</u>
1 Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds	17
1.1 Processus de formation des systèmes hydrothermaux	17
1.2 Localisation des sites hydrothermaux	20
1.3 Les sources hydrothermales abyssales de l'Atlantique	22
1.4 Le site Rainbow	22
2 Faune des écosystèmes hydrothermaux océaniques	24
2.1 Caractéristiques	24
2.2 Le réseau trophique	25
2.3 Faune de la dorsale médio-Atlantique	27
3 Les communautés microbiennes des écosystèmes hydrothermaux océaniques	28
3.1 Habitats	28
3.2 Diversité phylogénétique des microorganismes associés aux sources hydrothermales océaniques	29
3.2.1 <i>Microorganismes associés aux animaux</i>	29
3.2.2 <i>Tapis microbiens</i>	31
3.2.3 <i>Colonisateurs in situ</i>	31
3.2.4 <i>Microorganismes des sédiments</i>	32
3.2.5 <i>Microorganismes des fluides</i>	33
3.2.6 <i>Microorganismes des cheminées et leur distribution</i>	33
3.3 Diversité des métabolismes	36
3.4 Diversité des microorganismes isolés	36
3.4.1 <i>Procaryotes thermophiles chimiolithoautotrophes</i>	37
3.4.2 <i>Procaryotes thermophiles organotrophes</i>	38
3.5 Les microorganismes et leurs interactions dans l'écosystème hydrothermal	48
4 La vie à haute température	51
4.1 La thermophilie	51
4.2 Phylogénie des thermophiles	53
4.3 Bases moléculaires de la thermophilie	54
4.3.1 <i>Les lipides</i>	54
4.3.2 <i>Les acides nucléiques</i>	55
4.3.3 <i>Les protéines</i>	56
4.4 Applications biotechnologiques des micro-organismes marins thermophiles	58

5 Méthodes pour décrire et accéder à la diversité microbienne	60
5.1 Taxonomie et définition d'espèce	60
5.2 L'approche culturale	64
5.2.1 Méthodes traditionnelles d'enrichissement et d'isolement	64
5.2.2 Stratégies originales d'enrichissement et d'isolement	64
5.3 L'approche "non culturale"	70
5.3.1 L'ARN ribosomique	71
5.3.2 Méthodologies	73
5.3.3 Les biais des méthodes d'analyses des séquences ribosomales.....	78
5.4 L'approche pluridisciplinaire et image actuelle de la diversité microbienne.....	80
6 Présentation de l'étude	83

MATERIEL ET METHODES	87
-----------------------------------	-----------

1 Cheminée hydrothermale et échantillonnage.....	87
2 Techniques de culture et conditions d'enrichissement.....	88
2.1 Milieu d'enrichissement "F1".....	88
2.2 Cultures en flacon	89
2.2.1 Verrerie.....	89
2.2.2 Préparation des milieux : stérilisation et répartition en anaérobiose.....	89
2.2.3 Les expériences de cultures d'enrichissement réalisées en fiole pénicilline (batch)	90
2.3 Culture en bioréacteur gas-lift.....	92
2.3.1 Les cultures en bioréacteur	92
2.3.2 Description du système de culture utilisant le bioréacteur gas-lift	94
2.3.3 Conditions des cultures d'enrichissement réalisées en bioréacteur gas-lift.	98
2.4 Suivi des cultures	99
2.4.1 Prélèvement d'échantillons	99
2.4.2 Dénombrement cellulaire	99
2.4.3 Techniques analytiques.....	99
2.5 Sous-cultures et isollements.....	103
2.5.1 Isolement par séries de dilution.....	103
2.5.2 Isolement par étalement sur boîte.....	103
3 Techniques moléculaires.....	104
3.1 Extraction d'ADN total	104
3.2 Amplification des gènes par PCR	105
3.3 Extraction d'ARN totaux et RT-PCR	108
3.4 DGGE.....	108
3.5 Clonage.....	111
3.6 Séquençage	112
3.7 Analyse phylogénétique	114
3.7.1 L'alignement	115
3.7.2 Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques.....	116
3.8 Hybridation sur cellules totales (whole cell hybridization)	118

4 Description d'une nouvelle espèce de microorganisme	120
4.1 Isolement, conditions et suivi de culture.....	120
4.2 Caractérisation morphologique de l'isolat	121
4.2.1 Microscopie optique	121
4.2.2 Détermination du Gram	121
4.2.3 Microscopie électronique à transmission	122
4.3 Détermination des conditions de croissance.....	122
4.3.1 Température.....	123
4.3.2 pH.....	123
4.3.3 Salinité.....	123
4.4 Caractérisation métabolique	123
4.4.1 Accepteurs d'électrons.....	123
4.4.2 Sources de carbone et/ou d'énergie	125
4.4.3 Sources d'azote.....	125
4.4.4 Test de la croissance en autotrophie	125
4.4.5 Analyse des produits du métabolisme.....	126
4.4.6 Influence de la phase gazeuse.....	126
4.5 Caractérisation génétique de l'isolat.....	127
4.5.1 Détermination du G+C mol%	127
4.5.2 Analyse phylogénétique de l'ADNr 16S	127

RESULTATS ET DISCUSSION **129**

Chapitre I : Diversité microbienne d'une cheminée hydrothermale du site Rainbow (36°14'N), Dorsale Médio-Atlantique.....129

Cambon-Bonavita, M.-A., Postec, A., Jean, J., Nadalig, T., Cambon, P., Etoubleau, J., Godfroy, A., Fouquet, Y. & Querellou, J. Microbial diversity from black smoker samples collected in Rainbow deep-sea hydrothermal vent field, Mid-Atlantic Ridge: ecological implications. En préparation.

1. Diversité morphologique.....	130
2. Extraction des acides nucléiques totaux et amplification des ADNr 16S.....	130
3. Diversité microbienne par DGGE.....	131
4. Diversité des clones archéens.....	131
5. Diversité des clones bactériens.....	134
6. Conclusion.....	137

Chapitre II : Diversité microbienne obtenue lors de cultures d'enrichissement en bioréacteur gas-lift à 90°C.....143

Postec, A., Urios, L., Lesongeur, L., Ollivier, B., Querellou, J. & Godfroy, A. (2005). Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems. *Curr Microbiol* **50**, 1-7..... 145

1. Tableaux et figures complémentaires.....	151
2. Résultats complémentaires et discussion.	155
3. Sous-cultures et isolements.	159
4. Effet de filtrats de <i>Thermococcales</i> sur la thermotolérance de <i>Marinitoga piezophila</i> (KA3)	163

Chapitre III : Diversité microbienne obtenue lors de cultures d'enrichissement en bioréacteur gas-lift à 60°C.....169

Postec, A., Lesongeur, L., Pignet, P., Ollivier, B., Querellou, J. & Godfroy, A. Cultivation of thermophilic microorganisms originating from a hydrothermal black chimney: molecular monitoring of batch and continuous enrichment cultures, and isolation of novel anaerobic thermophiles. Soumis.....171

Chapitre IV : Caractérisation d'une nouvelle espèce bactérienne du genre *Marinitoga*.....199

Postec, A., Le Breton, C., Fardeau, M.-L., Lesongeur, F., Pignet, P., Querellou, J., Ollivier, B. & Godfroy, A. (2005) *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov., a novel member of the order *Thermotogales* isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1217-1221.....201

Résultats complémentaires206

DISCUSSION GENERALE209

CONCLUSION ET PERSPECTIVES217

BIBLIOGRAPHIE221

ANNEXES235

Annexe 1

Extraction des ARN totaux et RT-PCR.....235

Annexe 2

Protocole de clonage (kit TOPO TA Cloning, Invitrogen®).....236

Annexe 3

Caractérisation d'une nouvelle espèce microbienne : exemple de calculs pour la détermination de la température optimale de croissance.238

Annexe 4

Postec, A., Pignet, P., Cueff-Gauchard, V., Schmitt, A., Querellou, J. & Godfroy, A. (2005). Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media. *Res Microbiol* **156**, 82-87.....241

Annexe 5

Urios, L., Cueff-Gauchard, V., Pignet, P., Postec, A., Fardeau, M. L., Ollivier, B. & Barbier, G. (2004). *Thermosipho atlanticus* sp. nov., a novel member of the *Thermotogales* isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1953-1957.....247

Abréviations

A : adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNr 16S : ADN codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
ADNr : ADN codant pour l'ARN ribosomal
ANME : anaerobic methano oxydant
APS : ammonium persulfate
ARDRA : amplified rDNA restriction analysis
ARN : acide ribonucléique
ARNr : ARN ribosomal
ATP : adénosine tri-phosphate
BAC : bacterial artificial chromosome
BET : bromure d'éthidium
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
C : Cytosine
CARD-FISH : Catalyzed Reporter Deposition coupled with Fluorescence *In Situ* Hybridization
D : taux de dilution
DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole
dNTP : désoxyribonucléotide
ddNTP : didésoxyribonucléotide
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMSO : dimethyl sulfoxide
EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique
EPR : East Pacific Rise
FISH : Fluorescent *in situ* hybridization
G : Guanine
GYPS : Glucose Yeast extract Peptone Sea salts
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
LB : Luria Bertani
MAR : Mid-Atlantic Ridge
NPP : Nombre le Plus Probable
ORF : open reading frame
pb : paire de bases
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
Q : débit
RFLP : Restriction Frangment Length Polymorphism
ROV : Remote Operated Vehicle
RT-PCR : Reverse Transcription-PCR
SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism
T : thymine
TAE : Tris-Acetate EDTA
TE : Tris-EDTA
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine
TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TTGE : Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
UFC : Unité Formant Colonies
UV : ultra-violet
v : volume
v.v.min⁻¹ : volume par volume et par minute
v/v : volume par volume
w/v : poids par volume

Table des illustrations

Introduction bibliographique

Tableau 1 : Composition des minéraux les plus souvent impliqués dans la formation des édifices hydrothermaux (Chevaldonné 1996).	20
Tableau 2 : Compositions et caractéristiques physico-chimiques comparées du fluide de Rainbow et de l'eau de mer.	23
Tableau 3 : Métabolismes microbiens associés aux sources hydrothermales océaniques (adapté de Karl 1995).	36
Tableau 4 : <i>Bacteria</i> associées aux sources hydrothermales océaniques.	40-44
Tableau 5 : <i>Archaea</i> associées aux sources hydrothermales océaniques.	45-47
Tableau 6 : Températures maximales de croissance des principaux groupes d'organismes (Hobel 2004).	52
Tableau 7 : Caractéristiques des <i>Bacteria</i> et des <i>Archaea</i>	54
Tableau 8 : Pourcentage de microorganismes cultivables au sein de différents types d'habitats, d'après Amann <i>et al.</i> (1995).	65
Figure 1 : Représentation schématique des sources hydrothermales océaniques (Baross & Deming 1993, Erauso 1994, Jannash & Mottl 1985).	18
Figure 2 : Fumeur noir.	19
Figure 3 : Fumeur blanc.	19
Figure 4 : Localisation des sites hydrothermaux marins profonds présentant une faune associée (Querellou <i>et al.</i> 2001).	21
Figure 5 : <i>Riftia pachyptila</i>	25
Figure 6 : <i>Alvinella pompejana</i> , ou "ver de Pompéi".	26
Figure 7 : <i>Rimicaris exoculata</i>	26
Figure 8 : <i>Bathymodiolus azoricus</i>	27
Figure 9 : Effet de la température sur les taux de croissance de microorganismes types : psychrophile, mésophile, thermophile et deux hyperthermophiles différents. Leurs optima de température respectifs sont indiqués sur le graphique (Madigan <i>et al.</i> 2003).	52
Figure 10 : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques. Ces données soutiennent la discrimination entre les trois domaines, deux d'entre eux contenant des représentants procaryotes (<i>Bacteria</i> et <i>Archaea</i>). L'enracinement représente la position supposée du dernier ancêtre commun universel. Les groupes phylogénétiques contenant des membres thermophiles ou exclusivement thermophiles sont indiqués en lignes pointillées (d'après Madigan <i>et al.</i> (2003), cité par Hobel (2004)).	53
Figure 11 : Structure membranaire des <i>Archaea</i> . (a) bicouche lipidique contenant des diéthers de glycérol, (b) monocouche lipidique contenant des tétraéther de glycérol (Madigan <i>et al.</i> 2003).	55
Figure 12 : Colonne de Winogradsky (http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/Winogradsky.html)...	67
Figure 13 : Chambre de culture (160 x 20 x 20 mm) utilisée pour l'étude de <i>Thermocrinis ruber</i> . Les constituants (plaques) en verre sont reliés par des joints en silicone (Huber <i>et al.</i> 1998).	68
Figure 14 : (a) Schéma du système de culture en continu utilisé pour la croissance de microorganismes hydrothermaux producteurs de filaments de soufre (SW: eau de mer oxygénée). (b) microphotographies de filaments de soufre produits dans la culture, barre = 10 µm, et (c) de microorganismes issus de la culture en bioréacteur (Taylor <i>et al.</i> 1999).	68

Figure 15 : Structure secondaire de l'ARNr 16S d' <i>E. coli</i> . (www.aw-bc.com/mathews/ch27/fi27p15.gif).	72
Figure 16 : Schéma global des techniques moléculaires pour l'étude de la structure et de la dynamique des communautés microbiennes.....	81
Figure 17 : Position phylogénétique des différents phyla bactériens (a) et archéens (b) d'après l'analyse de séquences d'ADNr 16S (méthode Neighbor-Joining). Les phyla possédant des représentants cultivés sont en noir, et les phyla ne possédant que des séquences environnementales sont en blanc. Barre d'échelle : 0,1 changement par nucléotide (Hugenholtz 2002).....	82

Matériel et Méthodes

Tableau 1 : Composition du milieu "F1" modifié d'après le milieu SME (Raven <i>et al.</i> 1992, Sharp & Raven 1997, Stetter <i>et al.</i> 1983).....	88
Tableau 2 : Conditions de l'analyse HPLC des acides aminés, sucres et acides organiques.....	102
Tableau 3 : Listes des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de fragments d'ADNr 16S archéens et bactériens, en vue de DGGE et de clonage. S = amorces "sens", AS = amorces "anti-sens". En gras apparaît le "GC-clamp" de 40 pb spécifique aux amorces sens de DGGE. Les appellations alternatives des amorces apparaissent en italique. La position des amorces correspond à <i>Escherichia coli</i> (pour les amorces "Bacteria") et à <i>Thermococcus celer</i> (pour les amorces "Archaea"). Certaines amorces sont dégénérées : Y = C ou T ; M = A ou C ; R = A ou G ; W = A ou T.....	107
Tableau 4 : Composition des solutions dénaturantes utilisées pour la réalisation des gels de DGGE.	109
Tableau 5 : Cycle de PCR pour la réaction de séquence.	113
Tableau 6 : Composition des solutions d'hybridation et de lavage.	118
Tableau 7 : Caractères phénotypiques et génotypiques déterminés lors de la caractérisation d'une souche microbienne (liste non-exhaustive).	120
Tableau 8 : Composition du milieu GYPS-pH6.	121
Figure 1 : Cheminée AT2E. (a) Photographie in situ de la cheminée colonisée par des crevettes <i>Rimicaris exoculata</i> , (b) photographie après échantillonnage (à bord), (c) schéma de cette même cheminée et des sous-échantillons AT2E1-8 collectés en fonction de leur structure minéralogique....	87
Figure 2 : Enceinte anaérobie.	90
Figure 3 : Schéma du protocole de cultures d'enrichissement en flacon représentant les durées d'incubation, le repiquage et les prélèvements réalisés, et ce en parallèle pour les cultures à 60°C et à 90°C.	91
Figure 4 : Photo de la chaîne de fermentation. (a) gestion informatisée, (b) chromatographie phase gazeuse, (c) réservoirs d'acide et de base, (d) débit-mètre à bille, (e) condenseur, (f) cuve, (g) bullage du gaz en sortie de cuve, (h) bain-marie chaud associé à la cuve, (i) pompe péristaltique (les bidons de milieux frais et de soutirage de culture n'apparaissent pas sur cette photo).	95
Figure 5 : Platine en Téflon percée de 11 entrées.....	95
Figure 6 : Représentation schématique du fermenteur gas-lift et des équipements associés.....	97
Figure 7 : (a) Flux de cellules dans une chambre d'analyse : lieu où le flux cellulaire est entouré par une gaine liquidienne extérieure et où il rencontre le rayon lumineux d'analyse ; (b) Interaction du faisceau lumineux et d'une cellule (www.anapath.necker.fr/).....	101
Figure 8 : Schéma d'une série de dilution.	103
Figure 9 : Schéma de la région d'ADNr amplifiée par PCR dans cette étude. Les amorces 1 et 2 amplifient un fragment d'environ 570 pb de l'ADNr 16S de <i>E. coli</i> . L'amorce 3 correspond à l'amorce 1 avec incorporation en 5' d'un "GC-clamp" de 40 pb.	106
Figure 10 : Schéma du fonctionnement d'un séquenceur automatique.	114

Résultats et discussion¹

Chapitre 1

Tableau 1 : Diversité archéenne de l'échantillon de cheminée : distribution et affiliation phylogénétique des 66 séquences d'ADNr 16S obtenues par clonage.132

Tableau 2 : Diversité bactérienne de l'échantillon de cheminée : distribution et affiliation phylogénétique des 96 séquences d'ADNr 16S obtenues par clonage. (SHOP = Source Hydrothermale Océanique Profonde, MAR = Mid Atlantic Ridge, EPR = East Pacific Rise)136

Figure 1 : Cellules totales extraites de l'échantillon de cheminée et observées en épifluorescence (X1000) après marquage au DAPI.130

Figure 2 : Distribution des séquences d'ADNr 16S d'*Archaea* obtenues par clonage à partir de l'échantillon de cheminée.131

Figure 3 : Distribution des séquences d'ADNr 16S de *Bacteria* obtenues par clonage à partir de l'échantillon de cheminée.135

Figure 4 : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences issues des cheminées 'AT2E' et 'PICO' au sein des *Archaea*. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 500 bootstrap.139

Figure 5 : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences issues des cheminées 'AT2E' et 'PICO' au sein des ϵ -*Proteobacteria*. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 500 bootstrap.140

Figure 6 : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences issues des cheminées 'AT2E' et 'PICO' au sein des γ - et δ -*Proteobacteria*. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 500 bootstrap.141

Figure 7 : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences issues des cheminées 'AT2E' et 'PICO' au sein des *Bacteria*, hors *Proteobacteria*. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 500 bootstrap.142

Chapitre 2

Tableau 1 : Distribution et affiliation phylogénétique des séquences clonées d'ADNr 16S archéennes. T7 et T28 correspondent aux échantillons de culture prélevés au 7^e et 28^e jour de culture respectivement.153

Tableau 2 : Distribution et affiliation phylogénétique des séquences clonées d'ADNr 16S bactériennes. T7 et T28 correspondent aux échantillons de culture prélevés au 7^e et 28^e jour de culture respectivement.154

Tableau 3 : Liste des paramètres qui ont été modifiés pour réaliser des sous-cultures en flacon.162

Figure 1 : Evolution de la densité cellulaire au cours de la culture d'enrichissement en continu. Après 34 h de culture en batch dans le bioréacteur, un taux de dilution $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ a été appliqué. Des banques de clones ont été réalisées à partir des échantillons T7 (prélevé au 7^e jour de culture) et T28 (prélevé au 28^e jour de culture). Au-dessus des flèches sont indiquées les affiliations phylogénétiques des séquences issues de l'analyse par DGGE, et les périodes au cours desquelles elles ont été détectées. Après 41 jours de culture, le taux de dilution a été augmenté étape par étape jusqu'à lessivage complet de la culture (991 h : $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, 1131 h : $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$, 1181 h : $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$, 1205 h : $D = 1 \text{ h}^{-1}$, 1210 h : $D = 2 \text{ h}^{-1}$).155

¹ Les tableaux et figures inclus dans les articles ne sont pas présentés dans ce paragraphe.

Figure 2 : Distribution des séquences archéennes et bactériennes, en fonction de leur affiliation phylogénétique, obtenues dans les banques de clones correspondant aux échantillons de culture d'enrichissement en bioréacteur T7 et T28 (prélevés au 7 ^e et 28 ^e jour de culture respectivement).	156
Figure 3 : Vitesses maximales de croissance en fonction de la température, de la souche <i>M. piezophila</i> cultivée sur milieu F1.	165
Figure 4 : Densités cellulaires moyennes obtenues à T1 (+ 4 h d'incubation) et T2 (+ 8 h d'incubation) lors de la croissance de <i>M. piezophila</i> à 70°C et 80°C sur différents milieux à base de filtrats de cultures de <i>Thermococcales</i> (T = <i>Thermococcus</i> sp. AT1260, P = <i>Pyrococcus</i> sp. AT1261, E = phase exponentielle, S = phase stationnaire). La croissance sur milieu F1 (milieu de la culture d'enrichissement en bioréacteur) sert de témoin.	167

Chapitre 4

Figure 1 : Effet de la concentration de H ₂ sur la densité cellulaire maximale (cellules. mL ⁻¹) lors de la croissance de <i>M. hydrogenitolerans</i> (AP1), <i>M. camini</i> (MV1075) et <i>M. piezophila</i> (KA3).	206
Figure 2 : Courbes représentant les optima de température, pH et salinité de <i>M. hydrogenitolerans</i> cultivée sur milieu GYPS.	207

Discussion générale

Figure 1 : Schéma présentant la consommation présumée des composants du milieu (sucres, substrats complexes, acétate, sulfate et soufre élémentaire) et la production des métabolites (CO ₂ , H ₂ et acétate) par les microorganismes hétérotrophes (<i>Marinitoga</i> sp., <i>Thermosiphon</i> sp., <i>Thermococcus</i> sp.), permettant d'expliquer le développement de souches autotrophes (<i>Thermodesulfator</i> sp. et <i>Deferribacter</i> sp.) dans la culture d'enrichissement en bioréacteur à 60°C.	212
Figure 2 : Positionnement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S d' <i>Archaea</i> obtenues dans les différentes études : à partir de l'échantillon de cheminée, en culture d'enrichissement (flacon ou fermenteur) à 90°C et 60°C et en culture d'isolement. L'ensemble des séquences appartient au phylum des <i>Euryarchaeota</i> , excepté les deux séquences de <i>Crenarchaeota</i> utilisées comme outgroup. 652 paires de bases ont été analysées, en utilisant la méthode du Neighbor-joining, avec correction de Jukes et Cantor. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées sur l'arbre.	213
Figure 3 : Positionnement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S d' <i>ε-Proteobacteria</i> obtenues dans les différentes études : à partir de l'échantillon de cheminée, en culture d'enrichissement (fermenteur) à 90°C. Les séquences d' <i>Alteromonas macleodii</i> et d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ont été utilisées comme outgroup. La méthode du Neighbor-joining, avec correction de Jukes et Cantor, a été appliquée. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées sur l'arbre.	214
Figure 4 : Positionnement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S de <i>γ</i> - et <i>δ-Proteobacteria</i> obtenues dans les différentes études : à partir de l'échantillon de cheminée, en culture d'enrichissement (fermenteur) à 90°C. Les séquences de <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Caminiella sporogenes</i> ont été utilisées comme outgroup. La méthode du Neighbor-joining, avec correction de Jukes et Cantor, a été appliquée. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées sur l'arbre.	215
Figure 5 : Positionnement phylogénétique des séquences bactériennes d'ADNr 16S, hors <i>Proteobacteria</i> , obtenues dans les différentes études : à partir de l'échantillon de cheminée, en culture d'enrichissement (fermenteur et flacon) à 60°C et 90°C, ainsi que les séquences correspondant aux souches isolées. Les séquences archéennes de <i>Methanocaldococcus jannashii</i> et <i>Thermococcus hydrothermalis</i> ont été utilisées comme outgroup. La méthode du Neighbor-joining, avec correction de Jukes et Cantor, a été appliquée. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées sur l'arbre.	216

C'est en 1977 qu'ont été découverts près des Galápagos les sources hydrothermales abyssales, associées à de véritables oasis de vie dans les grandes profondeurs océaniques (Corliss & Ballard 1977). Ces écosystèmes constituent des environnements extrêmes. Ils sont caractérisés par une pression hydrostatique élevée et l'émission de fluides chauds dont les températures peuvent atteindre 400°C, et sont chargés en éléments réduits (H₂, CH₄, H₂S etc.), en métaux, et en CO₂. Le mélange de ce fluide avec l'eau de mer froide engendre des gradients thermiques et chimiques abrupts. La découverte d'une étonnante "explosion de vie" (communautés animales de fortes biomasses) dans un tel milieu, hostile et instable, a été l'une des dernières grandes découvertes dans les domaines de l'océanographie biologique. Les microorganismes qui colonisent ces écosystèmes sont capables de tolérer des conditions extrêmes. Les microorganismes thermophiles en particulier constituent une source d'enzymes thermostables potentiellement utiles pour des applications biotechnologiques et des développements industriels.

L'étude des microorganismes a longtemps été limitée à la capacité des microbiologistes à recréer *in vitro* des conditions favorables à la croissance des communautés microbiennes. Il est généralement admis que moins de 10% de la microflore environnementale est accessible en culture pure. Le développement des techniques de biologie moléculaire basées sur l'étude de la molécule d'ARN ribosomique comme marqueur évolutif a permis de s'affranchir de l'étape de culture pour identifier les microorganismes d'un environnement. Ces techniques permettent d'établir des relations phylogénétiques entre différents organismes vivants. Ainsi, de nouveaux taxons ont été découverts, qui ne sont représentés par aucun microorganisme cultivé. C'est le cas en particulier dans les écosystèmes extrêmes mais également dans d'autres environnements (sol, sédiments, etc.) où un grand nombre de microorganismes échappe à toute méthode de culture. Par conséquent, les caractères physiologiques et le rôle écologique de ces microorganismes restent encore à élucider. Or, il est particulièrement difficile de simuler au laboratoire les conditions physico-chimiques d'écosystèmes extrêmes tels que les sources hydrothermales océaniques profondes (fortes températures, fortes pressions, absence d'oxygène, fluctuation des sources de nutriments et d'énergie etc.) Il existe également des interactions biologiques *in situ* à l'échelle des microorganismes que l'on ne sait pas toujours reconstituer *in vitro*. Le développement de nouvelles stratégies de culture apparaît alors comme une nécessité pour poursuivre l'exploration de la diversité microbienne.

A mon arrivée au LMBE (Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologies des Extrémophiles), l'activité du laboratoire était centrée sur l'étude des microorganismes issus des sources hydrothermales et de leurs applications potentielles dans le domaine des biotechnologies. Ces travaux ont conduit à la description et à la publication de plusieurs

espèces thermophiles et hyperthermophiles appartenant aux domaines des *Archaea* et des *Bacteria*, principalement hétérotrophes, et à la mise en œuvre d'un système de fermentation (gas-lift), dédié à la culture de ces microorganismes.

Au cours de cette thèse, j'ai appliqué une méthode originale d'enrichissement utilisant un fermenteur gas-lift et la mise en œuvre de cultures en continu pendant plusieurs semaines. Dans la continuité des activités du laboratoire, ces cultures ont été réalisées sur milieu complexe, en anaérobiose et dans des conditions de thermophilie (60°C) et d'hyperthermophilie (90°C).

Ce travail avait pour objectif de répondre aux questions suivantes :

- les cultures d'enrichissement en continu, obtenues en utilisant le fermenteur gas-lift, permettent-elles d'accéder à des populations microbiennes en culture dont la diversité phylogénétique est plus large que celle obtenue classiquement lors de cultures d'enrichissement en flacon ? Cette méthode d'enrichissement permet-elle d'accéder à de nouveaux microorganismes, en particulier au sein des thermophiles et hyperthermophiles ?

- existe-t-il une dynamique temporelle des populations microbiennes hydrothermales cultivées en continu pendant plusieurs semaines dans un bioréacteur gas-lift ?

Dans l'introduction bibliographiques sont présentés les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds et quelques caractéristiques de la faune qui y est associée, puis les communautés microbiennes de ces écosystèmes avec un intérêt particulier pour la thermophilie. Enfin sont présentées des méthodes culturales et moléculaires permettant d'accéder à la diversité des communautés microbiennes.

Introduction bibliographique

1 Les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds

Ce n'est qu'en 1977 que les premières plongées profondes du submersible américain Alvin ont permis la découverte des sources hydrothermales océaniques auxquelles étaient associés de formidables oasis de vie (Corliss & Ballard 1977, Corliss *et al.* 1979, Lonsdale 1977). La découverte des sources hydrothermales océaniques a eu un impact important sur notre approche de la biologie des océans profonds.

1.1 Processus de formation des systèmes hydrothermaux

Les phénomènes hydrothermaux océaniques sont une conséquence indirecte des phénomènes d'extension et d'accrétion des plaques tectoniques. Ainsi les sources hydrothermales sont localisées au niveau des dorsales médio-océaniques de l'Atlantique, du Pacifique et de l'Océan Indien, et des bassins arrière-arcs (Figure 4).

Au niveau des zones d'accrétion océaniques que sont les dorsales, le magma ($\approx 1200^\circ\text{C}$) remonte et forme des poches ou chambres magmatiques à quelques kilomètres de profondeur. En se refroidissant, il se rétracte et génère des anfractuosités au niveau de la croûte océanique. L'eau de mer froide ($\approx 2^\circ\text{C}$) s'infiltré jusqu'à une profondeur de plusieurs kilomètres et s'échauffe à proximité du magma. Sous l'effet de fortes températures et fortes pressions, le pouvoir de solubilisation de l'eau est augmenté. Le fluide chaud remonte vers le plancher océanique sous l'effet de la pression. Il lessive alors les roches environnantes, s'acidifie et s'enrichit en éléments métalliques (Figure 1).

La composition des fluides émis est fonction de la température et de la nature des roches traversées. Les fluides se distinguent nettement de l'eau de mer environnante par leur température pouvant atteindre 400°C , par un pH généralement acide, un caractère anoxique, et de fortes concentrations en gaz dissous (H_2S , CH_4 , CO , CO_2 , H_2) et ions métalliques (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Si^+ , Zn^{2+}). Les fluides sont appauvris en Mg^{2+} , SO_4^{2-} , NO_3^- , et PO_4^{3-} . Leur salinité est variable (de 0,1 à 2 fois celle de l'eau de mer). Le fluide hydrothermal ainsi formé rejait au niveau du plancher océanique en des points focalisés constituant les sources hydrothermales. Selon le degré de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer avant son émission, la composition, la température et le débit du fluide en sortie peuvent varier d'un site à l'autre, ou même selon les points d'émission sur un même site. Les caractéristiques physico-chimiques du fluide contrastent fortement avec celles de l'eau de mer, froide, légèrement alcaline et oxygénée. A son émission, lorsque le fluide chaud entre en contact avec l'eau de mer, les minéraux précipitent successivement en fonction de leur stabilité dans les conditions physico-chimiques du milieu pour former des édifices minéraux. Les fumeurs noirs et les fumeurs blancs ou diffuseurs sont les principaux édifices hydrothermaux observés. Cependant, tous les types d'intermédiaires existent. D'autres

manifestations hydrothermales se produisent au sommet de certains monts sous-marins (seamounts).

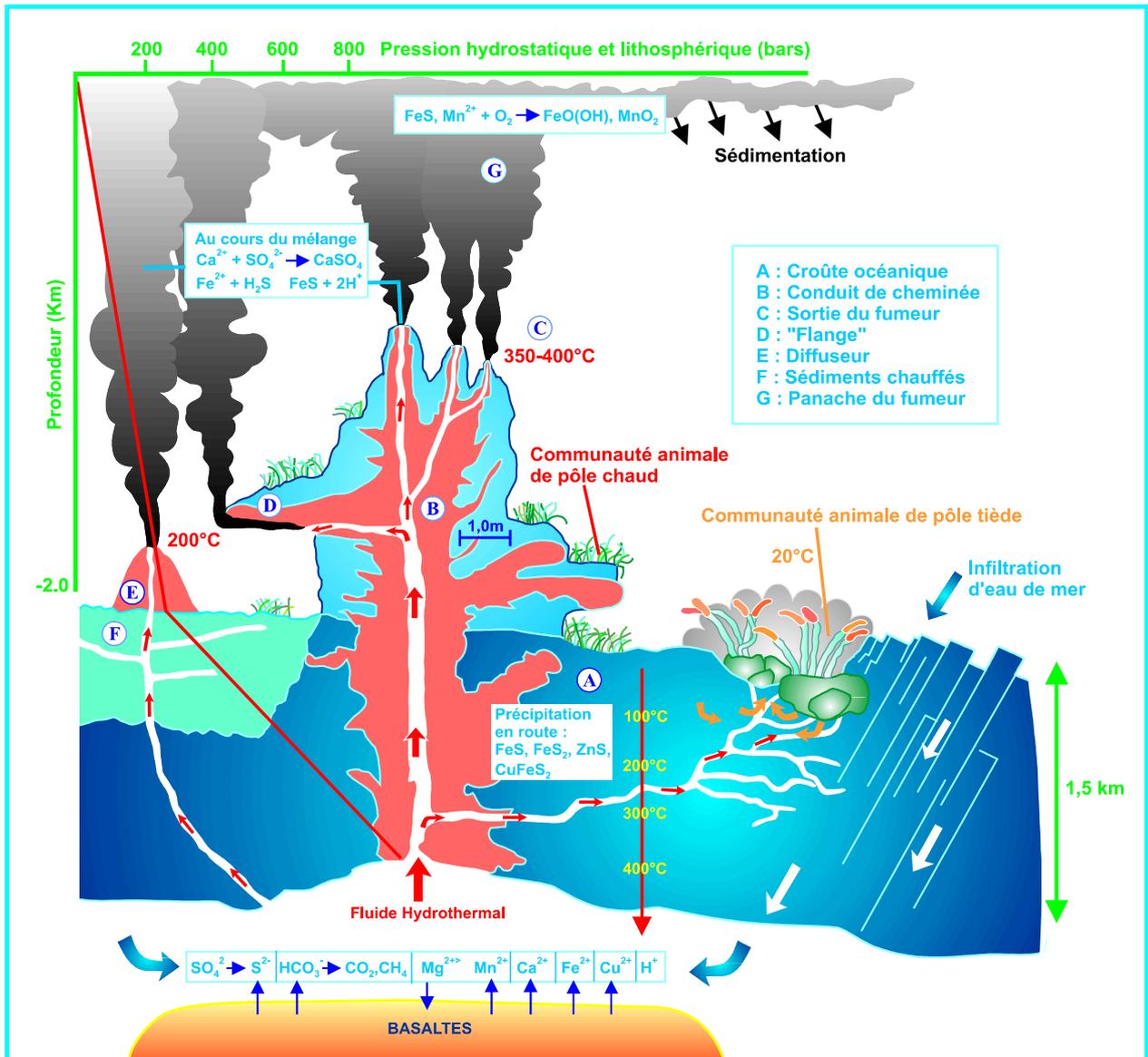


Figure 1 : Représentation schématique des sources hydrothermales océaniques (Baross & Deming 1985, Erauso 1994, Jannash & Mottl 1985).

➤ Les fumeurs noirs (Figure 2)

L'édification d'une cheminée hydrothermale se déroule en plusieurs étapes (Fouquet *et al.* 1988). Lorsque le fluide ne subit pas de dilution avec l'eau de mer, sa température au point d'émission est très élevée (350°-400°C) et son débit important (0,4-3 m.s⁻¹) (Lowell & Rona 1995). Au contact de l'eau de mer se forme une matrice poreuse de sels de sulfates BaSO₄ (barytine) et CaSO₄ (anhydrite) à partir des ions sulfates de l'eau de mer dont le fluide est dépourvu. La paroi de l'édifice croît verticalement par dépôt des sulfures métalliques de cuivre, zinc et fer (chalcopyrite, pyrrhotite, pyrite et sphalérite) sur la surface externe. La porosité de cette paroi diminue progressivement au cours du temps, créant une séparation physique entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. La température augmente au centre de la cheminée. Des sulfures de cuivre et fer (pyrite, marcassite, pyrrhotite, chalcopyrite, isocubanite) précipitent sur la paroi interne de l'édifice pour former le conduit central. La cheminée commence à croître latéralement par remplacement de l'anhydrite par des sulfures comme la chalcopyrite plus stables dans les nouvelles conditions de température de la cheminée. Dans le gradient de température ainsi créé, les minéraux s'organisent de manière concentrique, stabilisant ainsi la structure de la cheminée. Globalement, les cheminées sont des édifices minéraux riches en sulfures de cuivre. La cheminée croît à la fois vers l'intérieur et vers l'extérieur. Les cheminées sont schématiquement représentées comme des structures cylindro-coniques, mais dans la réalité, ce sont des structures irrégulières présentant de nombreux canaux et cavités. Des expansions latérales ou "flanges" peuvent également se former. On estime que la durée de vie d'une cheminée peut atteindre plusieurs dizaines d'années, mais elle peut être plus courte (1 à 5 ans) sur des zones très actives telles que la dorsale du Pacifique oriental.



Figure 2 : Fumeur noir.

➤ Les fumeurs blancs ou diffuseurs (Figure 3)

Ces édifices se forment lorsque le fluide hydrothermal a été dilué par l'eau de mer avant son émission. Dans ce cas, sa température est abaissée (< 280°C). Ce fluide diffuse à faible vitesse (0,1-0,5 m.s⁻¹) au travers d'un réseau de petits canaux, le diffuseur étant généralement dépourvu de conduit central (Fouquet 1997, Fouquet *et al.* 1988). Les minéraux dominants dans la matrice sont des sulfures de zinc et de fer (sphalérite, wurtzite). Il n'y a pas ou peu d'anhydrite, et peu de cuivre.



Figure 3 : Fumeur blanc.

Ce sont globalement des édifices minéraux riches en zinc. Cet hydrothermalisme se manifeste sous forme d'émissions diffuses fréquemment translucides ou peu chargées en particules.

Tableau 1 : Composition des minéraux les plus souvent impliqués dans la formation des édifices hydrothermaux (Chevaldonné 1996).

Type	Minéral	Formule idéale
Sulfures de zinc et fer	Sphalérite	(Zn, Fe)S
	Wurtzite	(Zn, Fe)S
Sulfures de fer	Pyrite	FeS ₂
	Marcassite	FeS ₂
	Pyrrhotite	Fe _{1-x} S
Oxydes de fer	Lépidocrocite	FeOOH
Sulfures de cuivre	Isocubanite	CuFe ₂ S ₃
	Chalcopyrite	CuFeS ₂
Sulfures de plomb	Galène	PbS
Sulfates	Anhydrite	CaSO ₄
	Barytine	BaSO ₄
Carbonates	Calcite	CaCO ₃
Silicates	Silice	SiO ₂

➤ Récemment la découverte du site hydrothermal Lost City (Kelley *et al.* 2001) a révélé l'existence d'un nouveau type d'édifice. Ce site est situé sur une croûte océanique de 1,5 millions d'années, à 15 km de l'axe d'expansion de la dorsale médio-Atlantique. Le pH du fluide est particulièrement basique et les édifices minéraux sont composés de carbonates (CaCO₃) et d'hydroxydes de magnésium (Mg(OH)₂). L'émission de fluide ne conduit pas toujours à la formation d'édifices minéraux. Ainsi, au niveau des laves en coussin ou "pillow lava", un fluide à basse température (6-23°C) peut diffuser à faible vitesse (0,5-2 cm.s⁻¹). Dans le bassin de Guaymas, on observe également des fluides qui percolent au travers de 400 m de sédiments d'origine planctonique très riches en matières organiques, hydrocarbures et sulfates.

1.2 Localisation des sites hydrothermaux

La carte (Figure 4) présente une liste non-exhaustive des sites hydrothermaux étudiés jusqu'à présent et pour lesquels une faune associée a été observée. La profondeur de ces sites varie entre 700 et 4000 m. Les sites hydrothermaux océaniques sont situés dans des zones à forte activité tectonique, le long de la dorsale Médio-Atlantique, de la dorsale du Pacifique oriental (EPR : East Pacific Rise), ou à proximité de zones de subduction, au niveau des bassins arrière-arcs du Pacifique occidental (Bassin de Lau, Bassin Nord-Fidjien, Bassin de Manus). Les sites du Pacifique ont été les plus visités, par rapport à ceux de l'océan Atlantique ou Indien. Sur une longueur totale de 60000 km, seules quelques centaines de kilomètres de dorsales ont été explorées à ce jour. A l'image des sites hydrothermaux récemment découverts dans l'océan Indien (Van Dover *et al.* 2001) et l'océan Atlantique (Rainbow, Lost city) (Charlou *et al.* 2002, Kelley *et al.* 2001), de nombreux sites restent probablement à découvrir.

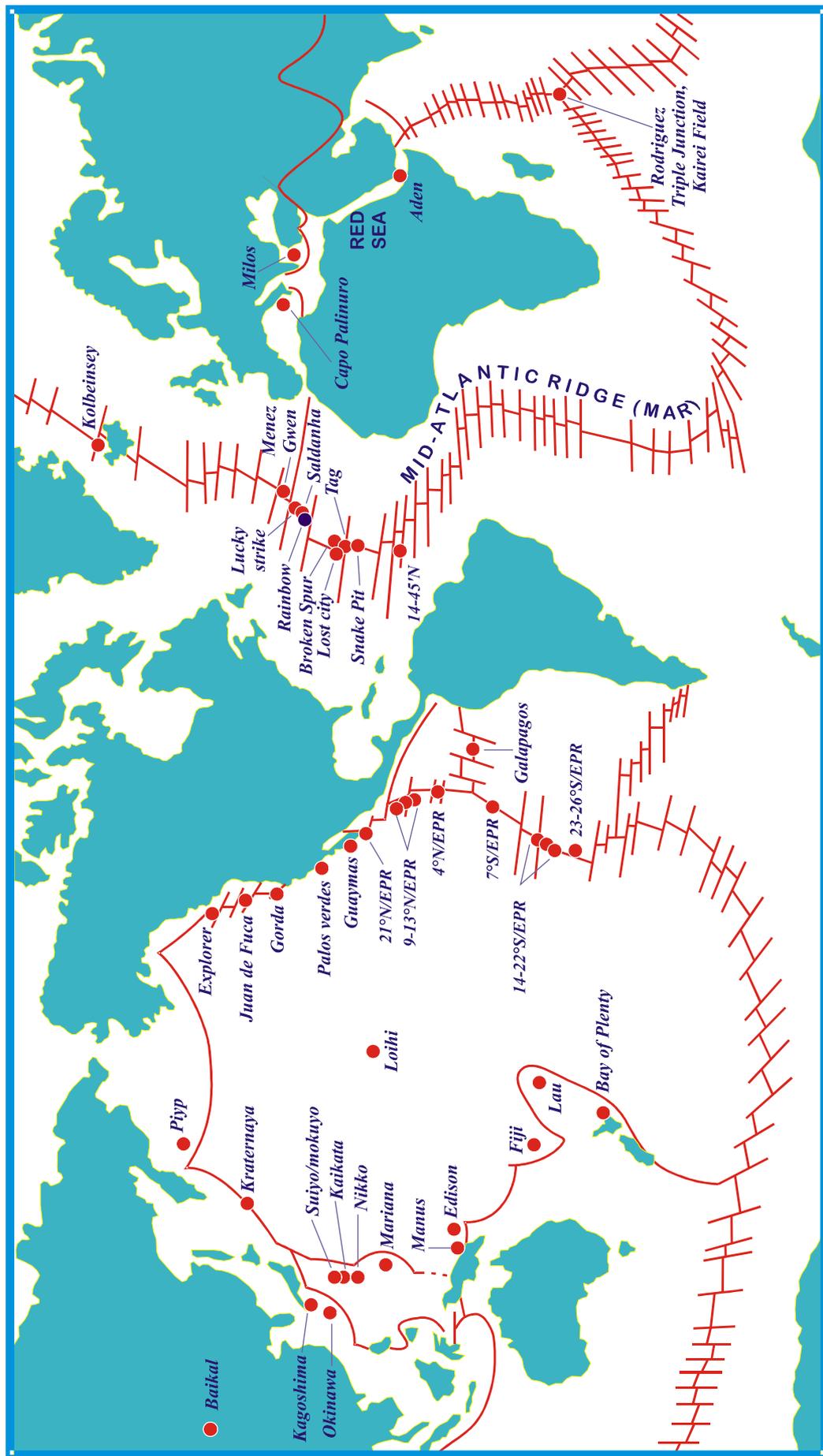


Figure 4 : Localisation des sites hydrothermaux marins profonds présentant une faune associée (Querrellou et al. 2001).

1.3 Les sources hydrothermales abyssales de l'Atlantique

Les sites de la ride Médio-Atlantique (MAR) ont été visités plus tardivement, car les océanographes ne pensaient pas qu'à une dorsale lente pouvait être associé un hydrothermalisme actif contemporain (expansion de 1 à 2 cm. an⁻¹ contre 18 cm. an⁻¹ sur les dorsales du Pacifique). L'exploration de cette dorsale océanique a débuté en 1985 et est restreinte à une section limitée par la zone 'Vema fracture' (11°N) au Sud, et par le plateau des Açores (38°N) au nord, avec pour exception quelques zones actives décrites à la périphérie de l'Islande. Depuis 1985, huit zones actives ont été étudiées sur la ride Médio-Atlantique (du Nord au Sud) : Menez-Gwen, Lucky Strike, Rainbow, Broken Spur, TAG, Snake Pit, Logatchev et Lost City. Les sites de l'Atlantique présentent des conditions environnementales très différentes d'un site à l'autre. Ces différences sont liées aux variations observées dans les profondeurs le long de l'axe et la nature des roches. Les zones les plus profondes (> 3000 m) sont relativement stables. Ainsi une activité hydrothermale de 26000 ans a été rapportée pour le site de TAG. Au contraire, les zones situées à moins de 3000 m de profondeur, en particulier Rainbow et Menez-Gwen, sont instables dans le temps et l'espace (Desbruyères *et al.* 2000). Le fer et le manganèse sont les métaux de transition les plus abondants dans les fluides hydrothermaux des sites de l'Atlantique. La variabilité de la composition du fluide serait largement influencée par la séparation de phase à haute température et à la nature des roches. Ainsi on retrouve des fluides pauvres en métaux (Menez-Gwen, Lucky Strike) ou des fluides enrichis en métaux (Rainbow, TAG). Les fluides acides issus de dorsales lentes ont d'abord été échantillonnés sur TAG à 26°N (dorsale Médio-Atlantique) en 1985. La plupart des sites hydrothermaux de MAR reposent sur une sous-couche basaltique. Toutefois, deux sites hydrothermaux reposent sur des roches du manteau terrestre (roche ultramafique) : Logatchev (14°45' N) découvert par des Russes en 1993-94 (Bogdanov *et al.* 1995), et Rainbow (36°14'N) découvert par les Français (Fouquet *et al.* 1997). Les fluides de ces sites présentent des concentrations en méthane élevées par rapport aux fluides issus de basaltes (Charlou *et al.* 2002, Douville *et al.* 2002).

1.4 Le site Rainbow

Le site Rainbow, localisé à 36°13'N, 33°54'W et 2350 m de profondeur, a été échantillonné pour la première fois pendant la campagne FLORES (submersible Nautille / l'Atalante) en 1997, (projet européen AMORES). Le panache de Rainbow a été détecté grâce à des anomalies géochimiques dans la colonne d'eau. Le site est localisé sur le flanc Ouest d'une ride non-volcanique. Le site se compose de 30 groupes de petites cheminées actives dispersées sur une aire de 15 000 m².

Tout comme Logatchev, le site Rainbow est situé sur une roche du manteau terrestre (Fouquet 1997), contrairement aux autres sites étudiés de la dorsale Médio-Atlantique. Les fluides émis par les fumeurs noirs y sont particulièrement acides (~pH 2.8) et chauds 365°C. Le pH acide des fluides de Rainbow résulte probablement des réactions de serpentinisation qui interviennent lors de l'interaction de l'eau de mer avec les roches ultramafiques. Ces réactions, qui impliquent l'oxydation exothermique de minéraux du manteau tels que l'olivine, le pyroxène et l'orthopyroxène en présence d'eau, peuvent libérer des quantités substantielles d'hydrogène H₂ et d'ions H⁺, d'ions ferriques et autres métaux de transition, de CO₂ et de composés organiques (acides gras, méthane etc.) Le fluide et le panache des sources hydrothermales situées sur une roche ultramafique sont caractérisés par des taux de H₂ et CH₄ particulièrement élevés. Les concentrations élevées en éléments traces dans le fluide sont favorisées par les hautes températures, le pH acide, et la teneur en chlorures, ce qui permet une forte stabilisation des métaux (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Cs, Pb, Y) par formation de complexes aqueux de chlorures. Ainsi, il est montré que l'hydrogène, le méthane, les métaux de transition (Fe, Mn, Co, Ni, Cu et Zn) et les éléments traces atteignent dans les fluides de Rainbow les concentrations les plus élevées jamais observées dans des fluides hydrothermaux de la dorsale Médio-Atlantique. Les fluides de Rainbow tout comme ceux de Logatchev présentent aussi des teneurs significativement plus faibles en H₂S, Si, Al et Li (Charlou *et al.* 2002, Douville *et al.* 2002).

Tableau 2 : Compositions et caractéristiques physico-chimiques comparées du fluide de Rainbow et de l'eau de mer.

Constituants ou propriétés	Rainbow^a	Eau de mer^b
Température (°C)	365	7
pH	2.8	8
H ₂ (mmol kg ⁻¹)	16	0
CH ₄ (mmol kg ⁻¹)	2.5	0
C ₂ H ₄ + C ₃ H ₆ (mmol kg ⁻¹)	1145	0
H ₂ S (mmol kg ⁻¹)	1.2	0
SO ₄ (mmol kg ⁻¹)	0	28.6
CO ₂ (mmol kg ⁻¹)	16	2.30
Total Fe (μmol kg ⁻¹)	24050	<0.001
CH ₄ / (C ₂ H ₄ + C ₃ H ₆)	2183	-

^a (Charlou *et al.* 2002)

^b mesure à 30°N dans l'Océan Atlantique à 700 m de profondeur (Schrenk *et al.* 2004)

2 Faune des écosystèmes hydrothermaux océaniques

L'une des caractéristiques les plus remarquables des sources hydrothermales abyssales est la faune luxuriante qui y est fréquemment associée. C'est lors de la première plongée sur des sources hydrothermales abyssales en 1977 que ces véritables "oasis de vie" ont été découverts sur la ride des Galápagos (Corliss & Ballard 1977). L'environnement abyssal où règne une obscurité totale, une température de 2°C et une forte pression hydrostatique était jusqu'alors considéré comme dépourvu de vie car dénué de production primaire photosynthétique. Elle est cependant également présente en périphérie des sites, bien que peu étudiée du fait de son caractère moins spectaculaire.

2.1 Caractéristiques

D'après Desbruyères *et al.* (2000) et Prieur & Marteinsson (1998), cette faune est caractérisée par :

- une biomasse très importante pouvant atteindre 50 kg. m⁻² et répartie sur des surfaces limitées (< 1 g. m⁻² pour l'environnement benthique marin profond "non-hydrothermal"),
- une diversité spécifique relativement faible, comparée aux communautés benthiques "non-hydrothermales",
- un fort taux d'endémisme : 97% des espèces appartiennent à de nouveaux taxons (du genre jusqu'à l'ordre),
- un développement inféodé aux microorganismes, en particulier les microorganismes symbiotiques impliqués dans la production primaire chimiosynthétique et la détoxification. Ces associations symbiotiques constituent l'une des caractéristiques majeures de cette faune,
- une distribution en auréoles concentriques autour des points d'émission du fluide. La vie hydrothermale se concentre dans la zone de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer, où les conditions sont extrêmement fluctuantes.
- des stratégies de propagation : l'activité hydrothermale est instable et les sources sont éphémères, surtout sur les dorsales à fort taux d'expansion. Pour coloniser de nouveaux sites, certains organismes utilisent leur mobilité, alors que pour les organismes fixés, ce sont leurs propagules (ex : larves) qui sont portées par les espèces mobiles ou les courants marins.

2.2 Le réseau trophique

La production primaire chimiosynthétique est assurée par des microorganismes qui constituent le premier maillon de la chaîne trophique hydrothermale. Les consommateurs primaires (également producteurs secondaires) se nourrissent de la production primaire chimiosynthétique. On y retrouve les associations symbiotiques dans lesquels l'hôte tire généralement son énergie d'un endosymbionte bactérien sulfo-oxydant et/ou méthanotrophe. Parmi les métazoaires pour lesquels ont été décrites des associations symbiotiques, on peut citer : le vestimentifère *Riftia pachyptila*, les mollusques bivalves *Bathymodiolus thermophilus*, *Bathymodiolus azoricus* et *Calyptogena magnifica*, les annélides polychètes du genre *Alvinella*, les crustacées *Rimicaris exoculata*, et les gastéropodes *Alviniconcha hessleri* et *Ifremeria nautilei*. Quelques représentants caractéristiques de la faune associée aux écosystèmes hydrothermaux océaniques sont présentés ci-dessous.

- ***Riftia pachyptila*** (Figure 5) est un long ver pouvant atteindre 2 m de long pour un diamètre de 4 à 5 cm. Les colonies peuvent atteindre 100 à 200 individus par m². Ce ver est dépourvu d'organe digestif. Son tronc contient un organe appelé trophosome renfermant les symbiotes bactériens ($3 \cdot 10^9$ cellules. g⁻¹ de tissu représentant 50% du poids de l'animal). Ces bactéries sulfoxydantes transforment les molécules inorganiques H₂S, CO₂ et O₂ en sucres assimilables par le vestimentifère. L'hémoglobine de ce ver



Figure 5 : *Riftia pachyptila*.

semble assurer le transport des molécules inorganiques vers les symbiotes mais la question est encore débattue (Flores *et al.* 2005, Zal 1999). En particulier le transport de H₂S sous une forme stable protège les deux partenaires des effets toxiques de cette molécule. Ce ver colonise la majeure partie des sites actifs de la Ride du Pacifique oriental.

- L'annélide polychète ***Alvinella pompejana*** (Figure 6) est remarquable par son association obligatoire avec une importante communauté épibiotique de bactéries filamenteuses recouvrant totalement la surface de son corps. Le métabolisme des épibiontes a fait l'objet d'hypothèses très controversées, l'une d'entre elles proposant un métabolisme mixotrophe par oxydation des sulfures (Desbruyères *et al.* 1998). La mise en évidence d'enzymes de fixation du CO₂ suggère une capacité de croissance par autotrophie (Campbell *et al.* 2003).



Figure 6 : *Alvinella pompejana*, ou "ver de Pompéi".

Ces vers sont des mangeurs de dépôts associés à l'hydrothermalisme du Pacifique. Ils sécrètent des tubes dans lesquels ils vivent, et à l'intérieur desquels a été mesuré un très fort gradient thermique de près de 60°C (22-81°C) (Chevaldonné *et al.* 1992). Les Alvinellidés peuvent supporter des températures très élevées par rapport à la majeure partie de la faune hydrothermale.

- La crevette *Rimicaris exoculata* (Figure 7), appartenant à la faune vagile, présente une association avec des bactéries. Un tapis microbien recouvre l'intérieur de la cavité branchiale et semble principalement composé d' ϵ -*Proteobacteria* (Polz & Cavanaugh 1995). Dans le tube digestif, une microflore nettement distincte composée d' ϵ -*Proteobacteria*, *Deferribacteres* et *Entomoplasmales* semble être liée au tractus digestif (Zbinden & Cambon-Bonavita 2003). Il semblerait que la crevette "cultive" des bactéries dans sa chambre branchiale (en y maintenant des conditions favorables). Une hypothèse émise serait qu'elle ingérerait ces épibiontes (Rieley *et al.* 1999, Segonzac *et al.* 1993), cependant la microflore détectée dans le tractus digestif ne confirme pas cette hypothèse. Des densités considérables de cette crevette, pouvant représenter jusqu'à 2500 individus par m³, ont été observées sur les sites hydrothermaux actifs de la Ride Médio-Atlantique (Segonzac 1992). Les communautés animales des sites hydrothermaux où les fluides présentent des teneurs élevées en métaux, chlorures et particules minérales sont dominées par *Rimicaris* spp.



Figure 7 : *Rimicaris exoculata*.

Parmi les consommateurs primaires, on retrouve également des brouteurs ou espèces dépositives qui se nourrissent en grande partie des bactéries se développant sur les cheminées. Les consommateurs secondaires sont constitués de prédateurs (crustacés, poissons, céphalopodes, etc.) qui s'alimentent des consommateurs primaires et des bactéries sans participer à la production de matière organique. Ces prédateurs appartiennent à des espèces inféodées aux sources hydrothermales ou à des espèces abyssales. Dans des zones plus éloignées des émissions de fluide, des animaux filtreurs (vers serpulidés, anémones de mer, éponges, etc.) se développent grâce aux particules émises par les sources hydrothermales.

- Les moules *Bathymodiolus azoricus* et *B. thermophilus* (*Mytilidae*) (Figure 8) sont associées à des bactéries endosymbiontes chimioautotrophes oxydant les sulfures, et aussi à des méthanotrophes dans le cas de *B. azoricus*.

Ces organismes sont capables de migration le long des gradients de sulfures et de croissance en présence de méthane. Ces espèces ont un comportement de filtreur, nécessitant un flux d'eau constant à travers ses branchies. Les communautés animales des sites hydrothermaux où les fluides présentent des teneurs faibles en métaux, chlorures et particules minérales sont dominées par *Bathymodiolus* spp.



Figure 8 : *Bathymodiolus azoricus*.

Notons toutefois que le concept de réseau trophique est théorique et simplificateur car en pratique, les interactions sont complexes. Ainsi, la dichotomie entre producteurs primaires et secondaires apparaît difficile à établir pour les espèces hydrothermales : plusieurs espèces inféodées aux sources hydrothermales seraient des espèces généralistes et ne se restreindraient pas à une seule source de nourriture.

2.3 Faune de la dorsale médio-Atlantique

Une description semi-quantitative de la composition de la faune associée aux 9 sites identifiés de la dorsale Médio-Atlantique révèle un continuum entre les sites dominés par *Rimicaris exoculata* et des sites dominés par *Bathymodiolus* spp. Cette distribution est liée à la teneur des fluides en métaux plutôt qu'à la zone géographique ou la profondeur. De plus la pénétration d'espèces non-hydrothermales dans l'environnement hydrothermal augmente quand la profondeur diminue et /ou quand la teneur en métaux des fluides diminue (ex : Menez-Gwen). Le long de la dorsale Médio-Atlantique, les conditions environnementales sont très différentes d'un site à l'autre. Ces différences sont liées à la profondeur des sites et à la nature des roches. Ces deux facteurs déterminent majoritairement les communautés des fumeurs de la dorsale Médio-Atlantique, contrairement aux sites du Pacifique pour lesquels l'isolement géographique est le déterminant principal des différences faunistiques. *Rimicaris exoculata* est l'espèce dominante sur les parois des cheminées de Rainbow. La crevette *Mirocaris fortunata* est également présente sur les parois et à la base des cheminées. La moule *Bathymodiolus azoricus* colonise la périphérie des cheminées, au sein de l'aire active. L'espèce carnivore dominante est le crabe *Segonzacia mesatlantica* (Desbruyères *et al.* 2001).

3 Les communautés microbiennes des écosystèmes hydrothermaux océaniques

La lumière ne pénètre approximativement que dans les 300 premiers mètres de l'océan et l'environnement marin profond est dépourvu de production primaire photosynthétique, qui est généralement à la base des écosystèmes sur Terre. Les communautés benthiques marines profondes sont alimentées par la production primaire de surface, qui est partiellement minéralisée lors de sa descente vers le plancher océanique. Hormis la production de surface, les communautés des écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds sont basées sur la chimiosynthèse bactérienne qui désigne la fixation de CO₂ à l'obscurité, par analogie avec le terme photosynthèse (Jannasch 1985, Jannasch & Wirsen 1979). Ces microorganismes, qualifiés de chimiolithoautotrophes, obtiennent leur énergie grâce à l'oxydation des composés réduits tels que les sulfures abondants dans les fluides émis. L'écosystème hydrothermal est un biotope dynamique qui offre des gradients chimiques et aussi thermiques particulièrement abrupts à l'échelle du centimètre, permettant ainsi à des microorganismes physiologiquement très différents de cohabiter. De plus, les conditions physico-chimiques et géologiques diffèrent d'un site à l'autre. Ainsi, les microorganismes de ces environnements présentent une diversité de métabolismes, de tolérances à l'oxygène ou de préférences de température et de pH.

3.1 Habitats

Différents types d'habitats des populations microbiennes ont été définis, malgré le caractère instable de l'environnement hydrothermal (Karl 1995) :

- le fluide hydrothermal où se développent des populations sous forme libre ou attachées à des particules. Cette microflore pourrait être issue d'une biosphère souterraine sous-jacente aux cheminées hydrothermales, ce concept de biosphère souterraine étant corroboré par de récentes études (Gold 1992, Huber *et al.* 2002b, Huber *et al.* 2003b, Takai *et al.* 2004d),
- la surface des cheminées, des animaux ou des sédiments exposés au fluide peuvent être le support du développement de microorganismes, notamment sous forme de biofilms (tapis microbiens),
- le panache correspondant à de l'eau de mer enrichie par les minéraux communément présents dans les fluides,
- la faune hydrothermale (vestimentifères, polychètes, mollusques, crustacés) parfois associée à une microflore par ecto- ou endosymbiose, ou épibiose,
- les sédiments de champs hydrothermaux où le fluide percole (ex : Bassin de Guaymas).

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

3.2 Diversité phylogénétique des microorganismes associés aux sources hydrothermales océaniques

Les études de diversité des communautés microbiennes, longtemps fondées sur des approches culturelles et des observations microscopiques, ont connu un essor considérable depuis le début des années quatre-vingt-dix grâce à l'émergence des techniques moléculaires basées sur les ARN ribosomiaux. En 1992, des analyses de lipides avaient montré la présence de liaisons éther, signature des *Archaea*, à l'intérieur d'une excroissance latérale de cheminée ("flange") (Hedrick *et al.* 1992). Au milieu des années quatre-vingts, les premières études moléculaires basées sur les ARN ribosomiaux (ARNr 5S) avaient permis d'affilier les symbiotes du vestimentifère *Riftia pachyptila* et ceux des mollusques *Calyptogena magnifica* et *Bathymodiolus thermophilus* à la sous-division γ des *Proteobacteria* (Lane *et al.* 1985, Stahl *et al.* 1984). Depuis une dizaine d'années, des inventaires moléculaires basés sur l'étude des séquences d'ARNr 16S ont été réalisés pour tenter de décrire dans sa globalité la diversité microbienne associée aux écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds. Ces études ont été menées sur une variété d'échantillons hydrothermaux (animaux, tapis microbiens, collecteurs *in situ*, sédiments, fluides, cheminées) provenant de différents sites géographiques.

3.2.1 Microorganismes associés aux animaux

Les travaux de Polz & Cavanaugh (1995) ont mis en évidence un phylotype bactérien dominant dans la population d'ectosymbiontes d'une cavité branchiale de crevette *Rimicaris exoculata* récoltée sur le site atlantique Snake Pit. Ce phylotype, également dominant dans un échantillon minéral du même site, était affilié à une branche monophylétique distincte au sein des ϵ -*Proteobacteria*. Une étude de 2003 présente l'analyse de la diversité microbienne associée à l'appareil digestif d'une crevette *Rimicaris exoculata* récoltée sur le site atlantique Rainbow. La diversité mise en évidence était relativement faible, et les séquences sont affiliées à trois groupes principaux : les ϵ -*Proteobacteria* (48,8%), les *Entomoplasmatales* (23,3%) et le nouveau phylum *Deferribacteres* (26,6%). Ces microorganismes pourraient être impliqués dans la production primaire de matière organique, dans la bioremédiation des métaux et la détoxification du tube digestif (Zbinden & Cambon-Bonavita 2003).

Lopez-Garcia *et al.* ont analysé la diversité microbienne associée aux tubes chitineux du vestimentifère *Riftia pachyptila* (Lopez-Garcia *et al.* 2002). Des populations microbiennes

denses ont été observées en microscopie. Seules des séquences d'ARNr 16S de bactéries ont été détectées. Celles-ci étaient affiliées aux ϵ -*Proteobacteria* (68%), aux δ -, α - et γ -*Proteobacteria*, aux *Verrucomicrobia*, au groupe *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* et à la division candidate OP8. La séquence de l'endosymbionte de *R. pachyptila* affiliée aux γ -*Proteobacteria* n'a pas été détectée.

Un ver polychète *Paralvinella palmiformis* de la famille des *Alvinellidae*, prélevé sur la dorsale du Pacifique oriental (Juan de Fuca), a fait l'objet d'une étude de la diversité moléculaire associée aux sécrétions muqueuses de l'animal. Les banques de clones étaient dominées par la présence de séquences affiliées aux ϵ -*Proteobacteria*. Des phylotypes appartenant aux *Cytophaga-Flavobacteria* et aux *Verrucomicrobia* étaient aussi largement représentés. Des séquences relatives aux *Fusobacteria*, aux bactéries vertes non-sulfureuses, aux *Firmicutes*, aux γ - et δ -*Proteobacteria* ont également été détectées. Ces microorganismes seraient impliqués dans la production primaire, le recyclage de matière organique et la détoxification du microhabitat chez *P. palmiformis* (Alain *et al.* 2002b). La diversité des séquences d'ADNr 16S de la communauté épibiotique d'*Alvinella pompejana* a été analysée en utilisant les techniques de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Campbell & Cary 2001, Haddad *et al.* 1995). Ces études ont démontré que cette communauté était dominée par quatre phylotypes appartenant aux ϵ -*Proteobacteria*. Des résultats de FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) obtenus avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de ces phylotypes ont indiqué que les phylotypes dominants correspondent au morphotype filamenteux qui prédomine dans la biomasse épibiotique d'après les observations microscopiques (Cary *et al.* 1997). L'activité de réduction dissimilatrice des sulfites a été mise en évidence au sein de la communauté microbienne associée à *A. pompejana* par la détection de fragments de gènes responsables de cette activité, suggérant ainsi un rôle important des bactéries sulfato-réductrices dans l'écologie de ce vers (Cottrell & Cary 1999). Deux souches appartenant aux ϵ -*Proteobacteria* (AM-N et AM-H) ont été enrichies et isolées à partir d'*A. pompejana* (Campbell *et al.* 2001). Récemment, deux souches appartenant aux ϵ -*Proteobacteria* ont été isolées à partir des tubes muqueux d'*A. pompejana* et décrites comme représentant de nouveaux genres (Alain *et al.* 2002d, Miroshnichenko *et al.* 2004a). A ce jour toutefois, toutes les tentatives de cultures des épibiontes filamenteux d'*Alvinella* ont échoué.

3.2.2 Tapis microbiens

La diversité moléculaire de tapis microbiens a été étudiée à partir d'échantillons présents sur des cheminées hydrothermales actives du Pacifique à Loihi Seamount, Hawaï (Moyer *et al.* 1995, Moyer *et al.* 1994, Moyer *et al.* 1998). La majorité des séquences

bactériennes d'ADNr 16S étaient affiliées aux *ε-Proteobacteria* (60.5%) et aux *γ-Proteobacteria* (27.1%). L'analyse des séquences archéennes a permis la découverte de nouveaux taxons au sein des *Crenarchaeota* et des *Euryarchaeota*. Au niveau de l'EPR 17°S, l'inventaire moléculaire réalisé sur un tapis microbien, prélevé sur une cheminée éteinte proche d'un fumeur actif, a permis la mise en évidence d'une grande majorité d'*ε-Proteobacteria* (98%) et quelques séquences de *γ-Proteobacteria* (Longnecker & Reysenbach 2001).

3.2.3 *Colonisateurs in situ*

Différents types de modules de colonisation déployés *in situ* ont servi de supports pour le développement de populations microbiennes dont la diversité phylogénétique a été analysée. En 2000, Reysenbach *et al.* (2000) ont étudié la diversité microbienne associée à une chambre de colonisation appelée "Vent Cap" déployée sur le site atlantique Snake Pit pendant cinq jours. Des températures variant de 70 à 20°C ont été mesurées dans le "Vent Cap" pendant la durée de l'incubation. La majorité des séquences archéennes détectées étaient affiliées à l'ordre des *Thermococcales* (71%) et des *Archaeoglobales* (22%). Une séquence relative au groupe thermoacidophile des *Thermoplasmatales* ainsi que des séquences de *Crenarchaeota* (Marine Group II) et *Euryarchaeota* ont également été obtenues. Au sein des séquences bactériennes, les principaux groupes représentés étaient les *ε-Proteobacteria* (40%), le genre *Desulfurobacterium* (25%) et les *Aquificales* (18%). La diversité phylogénétique a été analysée à partir d'un colonisateur Vent Cap déployé cinq jours sur une autre cheminée du même site (Snake Pit, dorsale Médio-Atlantique). Les *ε-Proteobacteria* étaient dominants (66%) (Corre *et al.* 2001).

En 2003, différents modules de colonisation ont été déposés sur la paroi de cheminées actives de la dorsale du Pacifique oriental (EPR 13°N). Ces modules ont été exposés à des températures de 50 à 100°C durant l'incubation *in situ* (Nercessian *et al.* 2003). Des expériences d'hybridation sur membrane au moyen de sondes oligonucléotidiques basées sur l'ARNr 16S ont montré que les populations archéennes représentaient 14 à 33% de la communauté procaryotique associée aux colonisateurs. Une large majorité des phylotypes archéens obtenus était affiliée à des isolats issus d'environnements similaires. Toutes les banques de clones étaient dominées par des phylotypes affiliés aux *Thermococcales*. Des membres des ordres *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Archaeoglobales* et *Desulfurococcales* ont également été détectés. D'autres séquences n'étaient affiliées à aucun représentant cultivé, et se groupaient au sein des *Crenarchaeota* (Marine Group I), '*Korarchaeota*' et DHVE (Deep-sea Hydrothermal Vent *Euryarchaeota*).

Un autre type de module de colonisation appelé TRAC (Titanium Ring for Alvinellid Colonization) a été déposé sur des colonies d'*Alvinellidae* proches de cheminées, et exposé à un fluide tiède (20 à 40°C). La première expérience a montré une colonisation très rapide des modules déposés sur la dorsale du Pacifique oriental (EPR 9°N et bassin de Guaymas) par des bactéries chimioautotrophes capables d'oxyder le H₂S. Ces microorganismes identifiés comme étant de nouvelles espèces du genre *Arcobacter*, membres des ϵ -*Proteobacteria*, excrétaient des filaments rigides de soufre élémentaire qui pourraient être à l'origine de l'établissement d'*Alvinellidae* observé après seulement onze jours (Taylor *et al.* 1999). Dans une étude récente (Alain *et al.* 2004), des TRAC ont été déployés au-dessus de colonies d'*Alvinellidae* sur la dorsale du Pacifique oriental (EPR 13°N). Les températures moyennes d'incubation selon les TRAC variaient de 5,2 à 33,6°C. Les ϵ -*Proteobacteria* étaient dominants au sein des tapis microbiens obtenus, trois des quatre banques étant dominées par un même phylotype (*AlviH2*).

Une autre étude présente la diversité phylogénétique des bactéries détectées sur des micro-colonisateurs après leur exposition pendant 15 jours près d'une cheminée du site atlantique de Lucky Strike (López-García 2003). Des séquences diversifiées affiliées aux ϵ -*Proteobacteria* étaient largement dominantes dans les banques analysées. Des séquences du groupe CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) ont également été détectées.

3.2.4 Microorganismes des sédiments

Les populations microbiennes de sédiments hydrothermaux ont fait l'objet d'analyses phylogénétiques des ADNr 16S. L'étude précédemment citée (López-García 2003) met en évidence une grande diversité de séquences bactériennes détectées dans des sédiments hydrothermaux du site atlantique Rainbow. Les phylotypes les plus représentés correspondaient à des γ -*Proteobacteria* (44%) et à des *Acidobacteria*. Toutes les sous-divisions des *Proteobacteria* ont été détectées. Les autres phylotypes appartenaient aux CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*), *Planctomycetales*, bactéries à Gram-positif à bas ou haut G+C%, aux *Nitrospirae* et à la division candidate TM7.

3.2.5 Microorganismes des fluides

Huber *et al.* (2002b, 2003b) se sont intéressés à l'évolution temporelle des populations microbiennes dans des fluides hydrothermaux. Après une éruption volcanique du volcan Axial de la dorsale Pacifique Juan de Fuca, des échantillons de fluides hydrothermaux ont été prélevés sur 3 années consécutives. L'analyse des communautés microbiennes associées à ces fluides avait pour but l'étude des microorganismes souterrains

sous-jacents aux cheminées, juste après une éruption volcanique et sur les 2 années suivantes. La communauté microbienne indigène au fluide, et par extrapolation à la biosphère souterraine, comporte des *Archaea* affiliés aux *Methanococcales* et à des *Euryarchaeota* incultivés, d'après l'analyse de séquences d'ADNr 16S. Au sein des *Bacteria*, une très grande diversité est mise en évidence et comporte des ϵ -*Proteobacteria*, des *Desulfurobacterium*, des bactéries Gram-positives et les nouvelles divisions WS6 et ABY1. Les auteurs montrent aussi que la diversité microbienne augmente au cours du temps, et que la fraction microbienne associée à des particules présente une diversité supérieure à la fraction sous forme libre. Dans une étude récente, Takai *et al.* (2004d) ont étudié des échantillons de fluide et de cheminées provenant du site hydrothermal Kairei de la dorsale médio-océanique indienne. Les auteurs avancent des arguments en faveur de l'existence d'un écosystème microbien de subsurface, sous-jacent à un site hydrothermal océanique actif. Cet écosystème serait basé sur l'hydrogène et constitué de microorganismes lithoautotrophes hyperthermophiles (Hyperthermophilic Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystem : HyperSLiME). Les résultats de cultures et d'analyses moléculaires suggèrent la prédominance d'espèces appartenant à l'ordre des *Methanococcales* et à l'ordre des *Thermococcales* dans les fluides et l'intérieur des cheminées étudiées. D'autres séquences d'*Archaea* mises en évidence étaient affiliées aux '*Korarchaeota*', aux *Desulfurococcales*, aux *Crenarchaeota* 'Marine group I', aux *Methanopyrales*, aux *Archaeoglobales* et aux *Euryarchaeota* DHVEG.

3.2.6 Microorganismes des cheminées et leur distribution

En 1999 et 2001, Takai *et al.* ont analysé la diversité phylogénétique des *Archaea* au niveau de cheminées hydrothermales du bassin de Manus et de la dépression d'Okinawa dans le Pacifique (Takai & Horikoshi 1999, Takai *et al.* 2001). Les expériences d'hybridation oligonucléotidiques ont montré que les *Archaea* représentaient 3 à 17,2% de la microflore totale présente sur échantillons de cheminées. Une très grande diversité phylogénétique a été mise en évidence. Les séquences détectées étaient affiliées aux *Methanococcales*, aux *Ignicoccales*, aux *Thermococcales*, aux *Archaeoglobales*, mais aussi à des nouvelles lignées de *Crenarchaeota*, d'*Euryarchaeota* et de '*Korarchaeota*'. De nombreuses séquences affiliées au groupe des halophiles *Halobacteriales* ont également été détectées. Les auteurs émettent l'hypothèse que les microorganismes hyperthermophiles et halophiles extrêmes détectés à l'intérieur de la cheminée proviendraient d'une biosphère profonde et auraient été transportés par le fluide hydrothermal. L'analyse de la distribution des *Archaea* a montré que les densités cellulaires les plus élevées étaient observées dans la couche de surface et dans la partie supérieure de la cheminée ($3,2 \cdot 10^7$ cellules. g⁻¹ de poids sec). Des membres thermophiles du genre *Thermococcus* et des membres du groupe des *Euryarchaeota*

incultivés DHVEG ont été détectés en abondance à la surface de la cheminée. Harmsen *et al.* (1997a, 1997b) avaient déjà mis en évidence des communautés microbiennes discrètes au niveau de cheminées de la dorsale médio-Atlantique en réalisant des cultures d'enrichissement et des hybridations *in situ* (FISH). Des densités croissantes en microorganismes avaient été observées, de l'intérieur de la cheminée vers l'extérieur, et de la partie inférieure vers la partie supérieure. Il a été montré que les *Archaea* pouvaient représenter jusqu'à 50% de la communauté microbienne associée à une cheminée (Harmsen *et al.* 1997b). Dans une autre étude de 1997, après extraction des cellules sur les parois externes de deux cheminées actives, une énumération a montré que la densité microbienne pouvait atteindre 10^{10} cellules g^{-1} (poids sec) (Chevaldonné & Godfroy 1997). Dans une récente étude, une analyse de diversité microbienne a été réalisée sur différentes fractions d'une cheminée prélevées sur la dorsale Juan de Fuca (Schrenk *et al.* 2003). Une diminution de l'abondance totale des microorganismes a été mise en évidence de l'extérieur de la cheminée ($> 10^8$ cellules. g^{-1}) vers l'intérieur ($< 10^5$ cellules. g^{-1}). Les observations microscopiques indiquaient que les microorganismes étaient attachés aux surfaces minérales de la cheminée. Des résultats d'hybridation sur cellules totales ont révélé une prédominance des *Archaea* dans la structure interne de la cheminée (habitat hyperthermophile) par rapport à la surface de la structure. Les banques de clones réalisées à partir de régions internes de la cheminée contenaient des séquences affiliées aux *Thermococcales*, aux *Archaeoglobales* et à des groupes de méthanogènes.

Une analyse de diversité a été réalisée sur des échantillons de cheminée du site atlantique Lost City récemment découvert et situé sur une roche d'affleurement du manteau (Schrenk *et al.* 2004). Les analyses phylogénétiques indiquent la présence d'un phylotype prédominant affilié aux *Methanosarcinales* formant un biofilm sur les parois d'une cheminée de carbonate.

Deux cheminées inactives, prélevées dans l'océan Pacifique et l'océan Indien, ont fait l'objet d'analyses de diversité microbienne (Suzuki *et al.* 2004). La densité en microorganismes a été estimée entre $1,7 \cdot 10^7$ et $3,0 \cdot 10^8$ cellules. mL^{-1} . La proportion des ADNr archéens détectés par PCR quantitative représentait tout au plus quelques pourcents des ADNr totaux. Les banques de clones contenaient des séquences affiliées aux *Nitrospirae*, *Chlorobi*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* et aux sous-divisions α , β , γ , δ et ϵ des *Proteobacteria*, ainsi que des *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota* (groupes d'incultivés). Cette composition de la communauté microbienne s'avère très différente de celle des cheminées actives. La présence en abondance de '*Magnetobacterium bavaricum*', une bactérie de la division des *Nitrospirae* et porteuse d'un magnétosome, a été mise en évidence dans chacun des échantillons.

Une étude récente présente la mise au point de 14 sondes oligonucléotidiques ciblant, sur différents rangs taxonomiques, des gènes d'ARNr 16S d'archées cultivées et incultivées (Nercessian 2004). L'utilisation de ces sondes confirme la large distribution des *Thermococcales*, *Desulfuroccocales*, *Methanocaldococcaceae* et *Archaeoglobus* dans les habitats hydrothermaux océaniques, et confirme l'absence apparente des *Thermoproteaceae* et des thermoacidophiles de l'ordre des *Sulfolobales* dans ces habitats. Les *Pyrodictiaceae* et les 'Korarchaeota', trop peu représentés ou absents dans les échantillons, n'ont pas été détectés.

Les méthodes moléculaires d'analyse des communautés microbiennes hydrothermales océaniques révèlent une très grande diversité des microorganismes, au sein des *Bacteria* et des *Archaea*. De façon remarquable, les ϵ -*Proteobacteria* sont dominants dans la plupart des études de diversité bactérienne, que ce soit au niveau d'échantillons de fluides, d'animaux ou de tapis microbiens. De plus, une diversité phylogénétique considérable est mise en évidence au sein des séquences d' ϵ -*Proteobacteria* détectées. Les ϵ -*Proteobacteria* auraient donc une fonction importante dans l'écosystème hydrothermal océanique. D'autre part, d'après les analyses moléculaires, la diversité des microorganismes hydrothermaux océaniques est répartie dans presque tous les phyla identifiés à ce jour. Au sein de ces phyla, on remarque que certaines séquences forment des lignées bien individualisées qui semblent être inféodées à cet écosystème profond. En outre, une grande proportion des séquences détectées correspond à de nouvelles lignées pour lesquelles aucun représentant cultivé n'a été décrit à ce jour. La poursuite des études culturelles et la diversification des méthodes de culture s'imposent alors pour accéder à ces microorganismes jusqu'à présent incultivés afin d'en étudier, outre la diversité phylogénétique, la diversité métabolique et biochimique.

3.3 Diversité des métabolismes

D'après les connaissances actuelles sur les métabolismes microbiens et sur les espèces chimiques disponibles dans les fluides hydrothermaux et l'eau de mer, la liste suivante (non-exhaustive) des voies métaboliques potentiellement existantes chez les microorganismes des sites hydrothermaux abyssaux a été établie :

Tableau 3 : métabolismes microbiens associés aux sources hydrothermales océaniques (adapté de Karl 1995).

Type respiratoire	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Source de carbone	Processus métabolique
Aérobie	H ₂	O ₂	CO ₂	Oxydation de l'hydrogène
	HS ⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	O ₂	CO ₂	Oxydation des composés soufrés
	Fe ²⁺	O ₂	CO ₂	Oxydation du fer
	Mn ²⁺	O ₂	CO ₂	Oxydation du manganèse
	NH ₃ , NO ₂ ⁻	O ₂	CO ₂	Nitrification ⁽¹⁾
	CH ₄ , CO (et autres composés en C1)	O ₂	CO ₂	Méthanotrophie, méthylophie
	[CH ₂ O] _n	O ₂	[CH ₂ O] _n	Hétérotrophie aérobie
Anaérobie	H ₂	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrification
	H ₂	S ⁰	CO ₂	Sulfo-réduction
	H ₂	SO ₄ ²⁻	CO ₂	Sulfato- thiosulfato-réduction
	H ₂	S ₂ O ₃ ²⁻	CO ₂	Méthanogénèse
	CH ₄	SO ₄ ²⁻	CO ₂ ou CH ₄	Oxydation anaérobie du méthane ⁽¹⁾
	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻ , (NO ₃ ⁻ , Fe ³⁺)	?	Oxydation anaérobie de l'ammoniac ⁽¹⁾
	S ²⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrification, sulfo-oxydation
	[CH ₂ O] _n	NO ₃ ⁻	[CH ₂ O] _n	Dénitrification
	[CH ₂ O] _n	S ⁰ , SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	[CH ₂ O] _n	Hétérotrophie, réduction de composés soufrés
	[CH ₂ O] _n	[CH ₂ O] _n	[CH ₂ O] _n	Fermentation

(1) il n'y a pas d'isolats décrits capables d'oxydation aérobie ou anaérobie de l'ammoniac, et d'oxydation anaérobie du méthane.

3.4 Diversité des microorganismes isolés

La communauté microbienne constitue la base de l'écosystème hydrothermal. Le biotope est caractérisé par des conditions environnementales extrêmes : hautes pressions hydrostatiques et températures, concentrations élevées en métaux lourds, gradients abrupts des paramètres physico-chimiques et des concentrations en substances requises pour le métabolisme, ce qui explique la grande diversité physiologique des microorganismes isolés de cet environnement (Tableau 3).

Les souches isolées des environnements hydrothermaux profonds représentent souvent de nouveaux taxons et le nombre d'espèces bactériennes et archéennes isolées est

en constante augmentation (3 en 1989, une centaine en 2004). Celles-ci sont recensées dans les tableaux 4 et 5.

3.4.1 Procaryotes thermophiles chimiolithoautotrophes

Au sein du domaine des *Archaea*, un fort pourcentage des isolats obtenus sont des anaérobies hyperthermophiles de l'ordre des *Methanococcales* (*Methanocaldococcus* et *Methanothermococcus*), appartenant aux *Methanoarchaea* (Ollivier & de Macario 2004). La méthanogénèse est le processus métabolique principal des membres de cet ordre. La méthanogénèse au niveau des sources hydrothermales est essentiellement lithoautotrophique (microorganismes hydrogénotrophes) (Miroshnichenko 2004).

Les microorganismes sulfato-réducteurs peuvent être des *Archaea* (e.g. *Archaeoglobus profundus*) ou des *Bacteria* (e.g. *Thermodesulfatator indicus*, *Thermodesulfabacterium hydrogeniphilum*).

Le soufre élémentaire présent dans le panache hydrothermal joue un rôle important dans le métabolisme lithotrophe. La réduction du soufre associée à l'oxydation de H₂ est la seule source d'énergie connue des membres anaérobies des genres bactériens *Balnearium* et *Desulfurobacterium* et du genre archéen *Ignicoccus*. L'hydrogène est également source d'énergie potentielle pour les ϵ -*Proteobacteria* thermophiles *Nautilia litotrophica* et *Caminibacter hydrogeniphilus*.

L'oxydation aérobie de l'hydrogène est la réaction énergétique clé des membres du genre *Persephonella*, endémique aux sources hydrothermales océaniques et appartenant à l'ordre des *Aquificales*. Outre l'oxygène, les membres du genre *Persephonella* sont aussi capables d'utiliser le nitrate ou les composés soufrés comme accepteur d'électrons. L'oxydation autotrophe de l'hydrogène est inhérente à *Hydrogenimonas thermophilus* et *Caminibacter profundus*, deux espèces appartenant aux ϵ -*Proteobacteria*. Parmi les *Archaea* des sources hydrothermales océaniques, ce catabolisme n'a été retrouvé que chez *Pyrolobus fumarii*, organisme anaérobie facultatif.

La réduction du fer par des microorganismes hydrothermaux profonds a d'abord été mise en évidence dans des cultures d'enrichissement (Slobodkin *et al.* 2001). Deux espèces Fe³⁺ réductrices sont actuellement décrites : l'archée *Geoglobus ahangarii* et la bactérie *Deferribacter abyssi*.

La réduction anaérobie du monoxyde de carbone a été mise en évidence chez *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *pacificus*, organisme lithotrophe facultatif (Fardeau *et al.* 2004). La capacité de croissance en anaérobiose en présence d'extraits de levures et de CO a été récemment montrée chez des archées du genre *Thermococcus*, genre pour lequel seules des chimioorganotrophes étaient connus (Sokolova *et al.* 2004).

3.4.2 Procaryotes thermophiles organotrophes

La plupart des microorganismes décrits sont des hétérotrophes anaérobies réduisant le soufre. Toutes les espèces hyperthermophiles des genres *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Palaeococcus* (ordre des *Thermococcales*, domaine des *Euryarchaeota*), ainsi que les espèces des genres *Staphylothermus* et *Pyrodictium* (domaine des *Crenarchaeota*) sont organotrophes et fermentaires. Leurs substrats pour la croissance sont principalement les peptides. De la fermentation de ces substrats résulte la formation d'acétate, propionate, isobutyrate, isovalérate, CO₂ et H₂. Le soufre élémentaire stimule considérablement la croissance, bien qu'il ne soit pas indispensable à certaines souches. L'étude du métabolisme de *Pyrococcus furiosus* (espèce littorale), organisme "modèle" au sein des *Thermococcales*, a permis la mise en évidence d'une dépendance du métabolisme peptidique vis-à-vis du soufre, et un rôle clé du soufre dans la régulation de trois hydrogénases (deux cytoplasmiques et une membranaire). Toutefois les mécanismes de dépendance au soufre restent inconnus. Il a également été montré que la croissance de *P. furiosus* en présence de peptides et de soufre était meilleure que sur carbohydrates (maltose) et que le soufre n'avait pas d'effet sur la croissance sur carbohydrates (Adams *et al.* 2001). Grâce à l'utilisation de puces à ADN construites à partir du génome de *Pyrococcus furiosus*, Shut *et al.* (2001, 2003) ont montré la surexpression de 9 ORF en présence de soufre, 2 d'entre elles se révélant jusqu'à 25 fois plus exprimées qu'en absence de soufre. Les auteurs proposent un rôle des protéines correspondantes dans la réduction du soufre. La dépendance du métabolisme peptidique vis-à-vis du soufre a également été démontrée pour d'autres espèces de *Thermococcales* d'origine hydrothermale : *Pyrococcus abyssi* ST549 et *Thermococcus hydrothermalis* (Godfroy pers. com, Godfroy *et al.* 2000, Postec *et al.* 2005).

Les bactéries organotrophes les plus thermophiles des sources hydrothermales abyssales sont des espèces appartenant aux genres *Thermosipho*, *Thermotoga* et *Marinitoga* (ordre des *Thermotogales*). Les températures optimales de ces microorganismes sont de 10 à 15°C en deçà de celles des archées des sources hydrothermales océaniques (optimum 55-80°C). Ils diffèrent aussi par une croissance préférentielle sur polysaccharides. Les bactéries des genres *Caminiella*, *Tepidibacter* et *Caloranaerobacter* représentent d'autres membres anaérobies, thermophiles modérés utilisant des substrats de type protéique.

Parmi les microorganismes organotrophes, des bactéries aérobies ont été mises en évidence : elles appartiennent aux genres *Thermus* et *Bacillus*. *Aeropyrum camini* est la seule archée aérobie stricte au sein des microorganismes hyperthermophiles hétérotrophes. La capacité de croissance par chimiolithotrophie et organotrophie a été montrée chez deux

nouvelles espèces hydrothermales de la famille des *Thermaceae* : *Oceanithermus profundus* et *Vulcanithermus mediatlanticus*, deux espèce microaérophiles.

Récemment, une archée coccoïde de très petite taille (400 nm de diamètre) a été cultivée exclusivement en coculture avec un hôte du genre *Ignicoccus* auquel elle est attachée (Huber *et al.* 2002a). Cette archée possède le plus petit génome archéen connu (0,5 Mb). Elle a été appelée '*Nanoarchaeum equitans*'. La séquence du gène codant pour son ARNr 16S présente une telle divergence avec les séquences des phyla *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* ou '*Korarchaeota*' (ce dernier n'étant connu qu'au travers de séquences environnementales) que la définition d'un nouveau phylum appelé '*Nanoarchaeota*' a été proposé. Les interactions entre microorganismes sont probablement importantes dans l'environnement hydrothermal. La réalisation de cocultures pourrait être un moyen d'accès aux microorganismes appartenant à des lignées d'incultivés.

Toutes les techniques permettant d'analyser la diversité microbienne, qu'elles soient moléculaires ou culturales, comportent des biais intrinsèques. Les méthodes moléculaires ont permis la mise en évidence d'une diversité phylogénétique importante. Entre 1 et 10 % seulement de cette diversité serait représentée par des souches isolées (Amann *et al.* 1995). De nombreux taxons détectés par méthodes moléculaires ne comportent donc à ce jour aucun membre cultivé. Il est alors difficile d'inférer un fonctionnement métabolique et un rôle écologique à des microorganismes détectés uniquement par méthodes moléculaires. Pour cultiver et isoler ces nouveaux microorganismes, des efforts sont nécessaires et devraient impliquer la diversification des conditions et des systèmes de culture. Il est aussi à noter que bon nombre d'isolats issus des sources hydrothermales océaniques appartiennent à des taxons qui n'ont pas été détectés jusqu'à présent par les études moléculaires. Ce constat souligne tout l'intérêt des études culturales encore aujourd'hui pour contribuer à une meilleure connaissance de la biodiversité microbienne hydrothermale.

Tableau 4 : Bacteria associées aux sources hydrothermales océaniques.

Affiliation et genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Aquificales					
<i>Persephonella</i>	<i>P. marina</i>	microaérophile, autotrophe, sulfo- thiosulfato- et hydrogène-oxydante, dénitrifiante	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	70	(Gotz et al. 2002)
	<i>P. guaymasensis</i>	microaérophile, autotrophe, sulfo- thiosulfato- et hydrogène-oxydante, dénitrifiante	Bassin de Guaymas, Pacifique	70	(Gotz et al. 2002)
	<i>P. hydrogeniphila</i>	microaérophile, autotrophe, hydrogène-oxydante, dénitrifiante	Suiyo Seamount, Pacifique	70	(Nakagawa et al. 2003)
'Desulfurobacteriales'					
<i>Desulfurobacterium</i>	<i>D. thermolithotrophum</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo- thiosulfato- réductrice	Snake Pit, Atlantique (MAR)	70	(L'Haridon et al. 1998)
	<i>D. crinifex</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice et dénitrifiante	CASM, Pacifique (JdFR)	60-65	(Alain et al. 2003)
<i>Balnearium</i>	<i>B. lithotrophicum</i>	Anaérobie, autotrophe, hydrogène-oxydante, Sulforéductrice	Suiyo seamount, Pacifique	70-75	(Takai et al. 2003c)
<i>Thermovibrio</i>	<i>T. ammonificans</i>	Anaérobie, autotrophe, nitrate et sulforéducteur	EPR 9.50°N	75	(Vetriani et al. 2004)
Thermotogales					
<i>Marinitoga</i>	<i>M. camini</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Menez-Gwen, Atlantique (MAR)	55	(Wery et al. 2001a)
	<i>M. piezophila</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Grandbonum, Pacifique (EPR 13°N)	65	(Alain et al. 2002a)
<i>Thermotoga</i>	<i>Thermotoga</i> sp.	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Snake Pit, Atlantique (MAR)	80	(Martinson et al. 1997)
<i>Thermosipho</i>	<i>T. melanesiensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Bassin de Lau, Pacifique	70	(Antoine et al. 1997)
	<i>T. japonicus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo- et thiosulfato-réductrice	Bassin de Iheya (Okinawa), Pacifique	72	(Takai & Horikoshi 2000)
	<i>T. atlanticus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire	Mid-Atlantic Ridge Menez Gwen	65	(Urios et al. 2004b)

Tableau 4 : Bacteria associées aux sources hydrothermales océaniques (suite).

Affiliation et genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Thermodesulfobactériales					
<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>T. hydrogeniphilum</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfato-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	75	(Jeanthon et al. 2002)
<i>Thermodesulfator</i>	<i>T. indicus</i>	Anaérobie autotrophe, sulfatoréducteur	Central Indian Ridge	70	(Moussard et al. 2004)
Nouvelle lignée					
<i>Caldithrix</i>	<i>C. abyssi</i>	Anaérobie, mixotrophe, fermentaire, dénitrification couplée à oxydation d'hydrogène ou d'acétate	Logatchev, Atlantique (MAR)	60	(Miroshnichenko et al. 2003a)
Groupe des Thermus-Deinococcus					
<i>Thermus</i>	<i>T. thermophilus</i> GY1211	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique	75	(Martinson et al. 1999a)
	<i>Thermus</i> sp.	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique et Snake Pit, Atlantique (MAR)	70-80	(Martinson et al. 1995)
<i>Marinithermus</i>	<i>M. hydrothermalis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Suiyo Seamount, Pacifique	67	(Sako et al. 2003)
<i>Oceanithermus</i>	<i>O. profundus</i>	Microaérophile, lithotrophe facultative oxydant l'hydrogène, organohétérotrophe,	Pacifique (EPR 13°N)	60	(Miroshnichenko et al. 2003b)
	<i>O. desulfurans</i>	Microaérophile, chimiohétérotrophe, réduit O ₂ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ et S ⁰	Suiyo Seamount, Pacifique	60	(Mori et al. 2004)
<i>Vulcanithermus</i>	<i>V. mediatlanticus</i>	Microaérophile, lithohétérotrophe réduisant O ₂ et NO ₃ ⁻	Rainbow, Atlantique (MAR)	70	(Miroshnichenko et al. 2003c)
Deferribactères					
<i>Deferribacter</i>	<i>D. desulfuricans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, réduisant le soufre, les nitrates et l'arsenate	Suiyo Seamount, Pacifique	60-65	(Takai et al. 2003b)
	<i>D. abyssi</i>	Anaérobie, litho ou organo-autotrophe, réduisant S ⁰ , NO ₃ ⁻ et Fe ³⁺	Rainbow et Ménez-Gwen, Atlantique (MAR)	60	(Miroshnichenko et al. 2003d)

Tableau 4 : Bacteria associées aux sources hydrothermales océaniques (suite).

Affiliation et genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Firmicutes					
<i>Caloranaerobacter</i>	<i>C. azorensis</i>	Anaérobie, fermentaire	Lucky Strike, Atlantique (MAR)	65	(Wery et al. 2001b)
<i>Caminicella</i>	<i>C. sporogenes</i>	Anaérobie, fermentaire	Elsa, Pacifique (EPR 13°N)	55-60	(Alain et al. 2002c)
<i>Clostridium</i>	<i>C. caminithermale</i>	Anaérobie, fermentaire, capable de réaliser la réaction de Stickland	Ménez-Gwen, Atlantique (MAR)	45	(Brisbarre et al. 2003)
<i>Tepidibacter</i>	<i>T. thalassicus</i>	Anaérobie, fermentaire, réduisant S°	Pacifique (EPR 13°N)	50	(Slobodkin et al. 2003)
	<i>T. formicigenes</i>	Anaérobie fermentaire	Menez Gwen(MAR)	45	(Urios et al. 2004a)
<i>Caldanaerobacter</i>	<i>C. subterraneus</i> <i>subsp. pacificus</i>	Anaérobie, fermentaire. Capable de croissance par lithotrophie sur CO	Pacifique (Okinawa)	70	(Sokolova et al. 2001) (Fardeau et al. 2004)
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Aérobie, hétérotrophe	Bassins de Guaymas et de Lau, Pacifique et Snake Pit, Atlantique (MAR)	60-80	(Marteinsson et al. 1996)
Proteobacteria					
α-Proteobacteria					
Indéterminé	Souche JF-1	Aérobie pratiquant la photosynthèse anoxygénique !	Pacifique (JdFR)	30	(Yurkov & Beatty 1998)
β-Proteobacteria					
<i>Thiobacillus</i>	<i>T. hydrothermalis</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le tetrathionate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates	Bassin Nord Fidjien, Pacifique	35	(Durand et al. 1993)
δ-Proteobacteria					
<i>Geothermobacter</i>	<i>G. ehrlichii</i>	Anaérobie, réduisant le fer ferrique et les nitrates	'Bag city', Pacifique (JdFR)	55	(Kashefi et al. 2003)
<i>Desulfovibrio</i>	<i>D. hydrothermalis</i>	Anaérobie, mixotrophe, sulfato-, sulfito-, thiosulfato-réductrice	Grandbonum, Pacifique (EPR 13°N)	35	(Alazard et al. 2003)

Tableau 4 : Bacteria associées aux sources hydrothermales océaniques (suite).

Affiliation et genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<i>γ-Proteobacteria</i> <i>Thiomicrospira</i>	<i>T. crunogena</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	Pacifique (EPR 21°N)	28-32	(Jannasch et al. 1985)
	<i>T. thermophila</i>	Microaérophile, sulfoxydante, chimolithomixotrophe	Mariana Arc, Ouest Pacifique	35-40	(Takai et al. 2004a)
	<i>Thiomicrospira</i> sp., strain MA-3	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	TAG, Atlantique (MAR)	28-32	(Wirsen et al. 1998)
	<i>Thiomicrospira</i> sp., strain L-12	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	Galápagos, Pacifique	25	(Ruby & Jannasch 1982)
<i>Vibrio</i>	<i>V. diabolicus</i>	Anaérobie facultatif, hétérotrophe	Pacifique (EPR 13°N)	30-45	(Raguénès et al. 1997)
<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin Nord Fidjien, Pacifique	25-35	(Raguénès et al. 1996)
	<i>A. infernus</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique	25-35	(Raguénès et al. 1997)
	<i>A. macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i> biovar <i>medioatlantica</i>	Aérobie, hétérotrophe	Snake Pit, Atlantique (MAR)	35-40	(Raguénès et al. 2003)
<i>Halomonas</i>	<i>H. neptunia</i>	Aérobie, hétérotrophe	Juan de Fuca, Pacifique	2	(Kaye et al. 2004)
	<i>H. sulfidaeris</i>	Aérobie, hétérotrophe	Juan de Fuca, Pacifique	20	(Kaye et al. 2004)
	<i>H. axialensis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Juan de Fuca, Pacifique	20	(Kaye et al. 2004)
	<i>H. hydrothermalis</i>	Aérobie, hétérotrophe	South pacific Ocean, Pacifique	20	(Kaye et al. 2004)

Tableau 4 : Bacteria associées aux sources hydrothermales océaniques (suite).

Affiliation et genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<i>ε-Proteobacteria</i> <i>Caminiibacter</i>	<i>C. hydrogeniphilus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice, dénitrifiante	Elsa, Pacifique (EPR 13°N)	60	(Alain et al. 2002e)
	<i>C. profundus</i>	Microaérophile, anaérobie autotrophe sulforéductrice, dénitrifiante	Rainbow (MAR)	55	(Miroshnichenko et al. 2004b)
	<i>C. mediatlanticus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice, dénitrifiante	Rainbow (MAR)	55	(Voordeckers et al. sous presse)
	<i>Nautilia</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice	Pacifique (EPR 13°N)	53	(Miroshnichenko et al. 2002)
<i>Sulfurospirillum</i>	<i>Sulfurospirillum</i> sp. Am-N	Anaérobie, hétérotrophe	Pacifique (EPR 13°N)	41	(Campbell et al. 2001)
<i>Sulfurimonas</i>	<i>S. autotrophica</i>	Autotrophe, soufre-oxydante	Mid-Okinawa Trough Pacifique	25	(Inagaki et al. 2003)
<i>Hydrogenimonas</i>	<i>H. thermophila</i>	Microaérophile, anaérobie, autotrophe, sulforéductrice, dénitrifiante	Central Indian ridge	55	(Takai et al. 2004b)
<i>Sulfurovum</i>	<i>S. lithotrophicum</i>	Microaérophile, anaérobie, autotrophe, soufre et thiosulfate oxydante	Okinawa Trough, Japon	28-30	(Inagaki et al. 2004)
<i>Thioreductor</i>	<i>T. micantisoli</i>	Autotrophe, anaérobie, sulforéductrice, dénitrifiante	Okinawa Trough, Japon	32	(Nakagawa et al. sous presse)
<i>Lebetimonas</i>	<i>L. acidiphila</i>	Autotrophe, anaérobie, sulforéductrice	Mariana Arc, Pacifique	50	(Takai et al. sous presse)
<i>ε-Proteobacteria</i>					(Takai et al. 2003a)

Tableau 5 : Archaea associées aux sources hydrothermales océaniques.

Affiliation et genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
'Nanoarchaeota' <i>Nanoarchaeum</i>	<i>N. equitans</i>	Enrichie en conditions d'anaérobiose et d'autotrophie	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	90	(Huber et al. 2002a)
Crenarchaeota Desulfurococcales <i>Desulfurococcus</i>	<i>Desulfurococcus</i> sp S et SY	Anaérobie, hétérotrophe, sulforéducteur	Pacifique (EPR 11°N)	85 et 90	(Jannasch et al. 1988)
<i>Ignicoccus</i>	<i>I. pacificus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réducteur	Pacifique (EPR 9°N 104°W)	90	(Huber et al. 2000b)
<i>Staphylothermus</i>	<i>S. marinus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, sulfo-réducteur	Pacifique (EPR 11°N)	85-92°C	(Fiala et al. 1986)
<i>Pyrodicticum</i>	<i>P. abyssi</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	97	(Pley et al. 1991)
	<i>Souche 121</i>	Réalise l'oxydation du formate couplée à la réduction du fer ferrique (formation magnétite)	Mothra (Finn), Pacifique (JdFR)	gamme : 85-121°C	(Kashefi & Lovley 2003)
<i>Pyrolobus</i>	<i>P. fumarii</i>	Anaérobie facultatif, autotrophe oxydant l'hydrogène et réduisant les nitrates, le thiosulfate	TAG, Atlantique (MAR)	106	(Blöchl et al. 1997a)
<i>Aeropyrum</i>	<i>A. camini</i>	Hétérotrophe aérobie	Suyio Seamount, Izu Bonin Arc, Pacifique	85	(Nakagawa et al. 2004)
Euryarchaeota Methanococcales <i>Methanocaldococcus</i>	<i>M. jannaschii</i> <i>M. infernus</i>	Anaérobie, méthanogène Anaérobie, méthanogène	Pacifique (EPR 21°N) Logatchev, Atlantique (MAR)	85 85	(Jones et al. 1983) (Jeanthon et al. 1998)
	<i>M. vulcanius</i> <i>M. indicus</i>	Anaérobie, méthanogène Anaérobie, méthanogène	Pacifique (EPR 13°N)	80 85	(Jeanthon et al. 1999) (L'Haridon et al. 2003)
<i>Methanothermococcus</i>	<i>M. okinawensis</i>	Anaérobie, méthanogène	Iheya Ridge, Pacifique (Okinawa)	60-65	(Takai et al. 2002)
<i>Methanoterris</i>	<i>M. formicicus</i>	Anaérobie, méthanogène	Central indian Ridge	75	(Takai et al. 2004c)
Methanopyrales <i>Methanopyrus</i>	<i>M. kandleri</i>	Anaérobie, méthanogène, sulfo-réducteur réduisant le CO ₂ ou le CH ₄	Bassin de Guaymas, Pacifique	98	(Burggraf et al. 1991, Huber et al. 1989, Kurr et al. 1991)

Tableau 5 : Archaea associées aux sources hydrothermales océaniques (suite).

Affiliation et genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Euryarchaeota (suite)					
Thermococcales					
<i>Thermococcus</i>	<i>T. guaymensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulforéducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Canganella & Jones 1994, Canganella et al. 1997, Canganella et al. 1998)
	<i>T. aggregans</i>	"	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	"
	<i>T. barossi</i>	"	Pacifique (JdFR)	82	(Duffaud et al. 1998)
	<i>T. fumicolans</i>	"	Bassin Nord Fidjien (Pacifique)	85	(Godfroy et al. 1996)
	<i>T. hydrothermalis</i>	"	Pacifique (EPR 21°N)	85	(Godfroy et al. 1997)
	<i>T. peptonophilus</i>	"	Pacifique (fosse des Mariannes)	85-90	(Gonzalez et al. 1995)
	<i>T. siculi</i>	"	Pacifique (Okinawa)	85	(Grote et al. 1999)
	<i>T. chitonophagus</i>	"	Bassin de Guaymas, Pacifique	85	(Huber et al. 1995)
	<i>T. barophilus</i>	"	Snake Pit, Atlantique (MAR)	85	(Marteinsson et al. 1999b)
	<i>T. atlanticus</i>	"	TAG, Atlantique (MAR)	85	(Cambon-Bonavita et al. 2003)
	<i>T. gammatolerans</i>	"	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Jolivet et al. 2003)
	<i>T. marinus</i>	"	Snake Pit (MAR)	88	(Jolivet et al. 2004)
	<i>T. radiotolerans</i>	"	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Jolivet et al. 2004)
	<i>Thermococcus</i> sp ES1	"	Juan de Fuca, Pacifique	82	(Pledger & Baross 1989)
	<i>Thermococcus</i> sp DT-1331	"	Minami-ensei Knoll, Mid-Okinawa Trough Pacifique		(Kwak et al. 1995)
	<i>Thermococcus</i> sp	"	EPR 11, 13 et 21°N		(Raguénès et al. 1995)
	<i>Thermococcus</i> sp	"	Bassin de Guaymas EPR		(Antoine et al. 1995)
	<i>Thermococcus</i> sp	"	Bassin de Guaymas EPR		(Lepage et al. 2004)
	<i>Thermococcus</i> sp	"	Juan de Fuca Ridge, Pacifique		(Holden et al. 2001)

Tableau 5 : Archaea associées aux sources hydrothermales océaniques (suite).

Affiliation et genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Euryarchaeota (suite)					
Thermococcales (suite)					
<i>Pyrococcus</i>	<i>P. abyssi</i>	"	Bassin Nord-Fidjien, Pacifique	96	(Erauso et al. 1993)
	<i>P. glycovorans</i>	"	Pacifique (EPR 13°N)	95	(Barbier et al. 1999)
	<i>P. horikoshii</i>	"	Pacifique (Okinawa)	98	(Gonzalez et al. 1998)
	<i>Pyrococcus</i> sp GB-D	"	Bassin de Guyamas Pacifique	95	(Jannasch et al. 1992)
	<i>Pyrococcus</i> sp ES4	"	Juan de Fuca, Pacifique	90-99	(Pledger & Baross 1991)
	<i>Pyrococcus</i> sp		EPR 13°N		(Lepage et al. 2004)
<i>Palaeococcus</i>	<i>P. ferrophilus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, réduisant le soufre (fer nécessaire comme cofacteur pour sa croissance)	Pacifique (Ogasawara)	83	(Takai et al. 2000)
Archaeoglobales					
<i>Archaeoglobus</i>	<i>A. profundus</i>	Anaérobie, mixotrophe, sulfato-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	82	(Burggraf et al. 1990)
	<i>A. veneficus</i>	Anaérobie, croissance en lithoautotrophie avec les sulfites ou le thiosulfate comme accepteurs ou respiration organotrophe des sulfites	Snake Pit, Atlantique (MAR)	75-80	(Huber et al. 1997)
<i>Geoglobus</i>	<i>G. ahangari</i>	Anaérobie, mixotrophe, croissance en lithoautotrophie ou en organohétérotrophie avec le fer ferrique comme accepteur d'électrons	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	(Kashefi et al. 2002)

3.5 Les microorganismes et leurs interactions dans l'écosystème hydrothermal

"L'écosystème est constitué au plan structural par l'association de deux composantes : un environnement physico-chimique, abiotique, spécifique, ayant une dimension spatio-temporelle bien définie, dénommé *biotope*, associé à une communauté vivante caractéristique de ce dernier, la *biocénose*. L'écosystème représente une unité fonctionnelle qui se perpétue de façon autonome au travers du flux de l'énergie et du cycle de la matière entre ses différentes composantes inertes et vivantes, lesquelles sont en constante interaction" (Ramade 1993). La structure d'une communauté microbienne au sein d'un écosystème est alors soumise à des fluctuations temporelles et spatiales correspondant à des phases de colonisation de nouveaux milieux ou de remplacement d'une communauté par une autre plus adaptée. Un grand nombre de facteurs peuvent modifier la composition d'une communauté microbienne : la disponibilité en sources de carbone, sources d'énergie et en accepteurs d'électrons, la température, le pH, l'oxygène, ou encore la lumière. Aussi pour survivre et se développer, les microorganismes adoptent différentes stratégies. D'autre part, aux facteurs extérieurs s'ajoutent de fortes interactions qui peuvent se produire au sein d'une population (coopération ou compétition) ou entre populations (synergie, symbiose et antagonisme).

Les travaux de microbiologie sur les sources hydrothermales océaniques ont conduit à la description de nouveaux taxons (paragraphe 3.4) et à l'étude de ces microorganismes en culture pure. Au cours de ces dix dernières années, les études de diversité utilisant des méthodes moléculaires (paragraphe 3.2) constituent les premières approches d'étude des communautés microbiennes hydrothermales dans leur globalité. Toutefois, les études d'écologie microbienne visant à étudier la place et le rôle des microorganismes dans l'environnement hydrothermal profond ainsi que les relations des microorganismes avec l'environnement et avec d'autres organismes sont encore peu nombreuses.

L'écosystème hydrothermal océanique comporte une richesse d'espèces chimiques permettant la croissance de microorganismes aux métabolismes très variés. L'eau de mer oxydée est riche en accepteurs d'électrons potentiels (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-}) alors que les fluides hydrothermaux sont riches en gaz réduits et dissous (H_2 , CH_4 , H_2S) qui constituent de potentiels donneurs d'électrons. Des réactions de serpentinisation peuvent aussi générer une augmentation des ions H^+ et de H_2 , des ions ferriques et autres métaux de transitions, de CO_2 , et de composés organiques (acides gras, méthane...). Ces composés, avec les métaux, sont susceptibles d'être utilisés par les microorganismes. Par ailleurs, les travaux de géomicrobiologie commencent à mettre en évidence l'existence d'une relation entre les édifices minéraux et les microorganismes au sein des écosystèmes hydrothermaux océaniques. Certains travaux tendent notamment à prouver que les microorganismes

oxydant le fer jouent un rôle géomicrobiologique dans les processus d'altération des roches hydrothermales (Edwards *et al.* 2003). Toutefois, un travail considérable reste à accomplir pour comprendre l'influence réciproque des communautés microbiennes et de la composition des édifices hydrothermaux. De plus, l'influence des conditions physico-chimiques de l'environnement sur des communautés microbiennes complexes reste peu étudiée.

Outre leur relation avec l'habitat, les microorganismes sont également en relation avec d'autres organismes vivants, qu'il s'agisse d'eucaryotes, microorganismes ou virus. Les microorganismes à la base du réseau trophique permettent le développement de communautés animales denses dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques (paragraphe 2.2). Les microorganismes peuvent avoir des relations de type endo- ou ectosymbiotique avec des vestimentifères, des mollusques, des crustacés, des gastéropodes. Différents types d'interactions peuvent exister, impliquant notamment la consommation de métabolites produits par une autre espèce. Les interactions entre microorganismes ont également une importance certaine dans l'environnement hydrothermal océanique et restent peu étudiées. L'association obligatoire de *Nanoarchaeum equitans* avec une espèce du genre *Ignicoccus* (paragraphe 3.4.2), décrite de façon préliminaire, constitue une des premières études véritables sur les associations microbiennes hydrothermales (Huber *et al.* 2003a). Des études récentes portent sur la recherche de relations entre les microorganismes et les virus. Une grande diversité morphologique de particules ressemblant à des virus a été mise en évidence par microscopie électronique à transmission à partir d'échantillons hydrothermaux de la dorsale Médio-Atlantique et de la dorsale du Pacifique oriental. Leurs hôtes appartiendraient à des membres archéens de l'ordre de *Thermococcales* (Geslin *et al.* 2003b). La première particule virale hydrothermale a été isolée récemment d'une souche de '*Pyrococcus abyssi*', provenant d'une cheminée hydrothermale du bassin Nord-Fidjien (Geslin *et al.* 2003a). Dans l'étude des relations entre microorganismes, les plasmides, les bactériophages et les transposons jouent un rôle important dans les transferts intra- et interspécifiques d'informations génétiques. Ces vecteurs ont un impact évolutif notable sur l'adaptation des microorganismes à leur environnement. Le transfert latéral de gènes a été mis en évidence entre *Archaea* et *Bacteria* et pourrait jouer un rôle dans l'adaptation des microorganismes à leur environnement et notamment à la température. Il a été montré que les bactéries hyperthermophiles *Thermotoga maritima* et *Aquifex aeolicus* comportaient un fort pourcentage de cadres ouverts de lecture (respectivement 24 et 16.2%) similaires à des gènes archéens. Ces observations indiqueraient que d'importants transferts de gènes latéraux auraient eu lieu entre *Bacteria* et *Archaea* hyperthermophiles, conduisant à l'hypothèse que ce processus aurait facilité l'acquisition de la thermophilie chez l'un ou l'autre des deux groupes (Nelson *et al.* 1999).

L'ensemble de ces interrelations existant très probablement dans le milieu naturel, tenter de les reproduire *in vitro* peut constituer une piste prometteuse pour accéder à la mise en culture et à l'étude de nouveaux microorganismes, et éventuellement de consortia, qui seraient impliqués dans ces relations. De plus, l'effet de changements physico-chimiques sur des populations microbiennes en co-culture reste peu connu et renseignerait sur le comportement des communautés microbiennes dans l'environnement hydrothermal, particulièrement instable et fluctuant en raison des gradients physico-chimiques abrupts.

4 La vie à haute température

La survie et la croissance des organismes vivants sont régies par de nombreux facteurs physico-chimiques de l'environnement, chaque organisme étant défini et caractérisé d'après des paramètres spécifiques qui sont nécessaires à son développement. Les écosystèmes incompatibles avec la vie humaine sont le plus souvent considérés comme extrêmes. C'est le cas lorsque les températures, généralement tempérées à la surface de la Terre (4-40°C), s'écartent de cette gamme. Ainsi, les microorganismes extrémophiles se développent de façon optimale dans des conditions extrêmes de température, de pH (<5 et >8), de salinité, de pression hydrostatique ou de radiations ionisantes. Les facteurs les plus importants pour la croissance des microorganismes extrémophiles sont la température élevée ou basse, le pH élevé ou bas et la salinité élevée. Les microorganismes sont alors qualifiés respectivement de thermophiles, psychrophiles, alcalophiles, acidophiles et halophiles. En considérant la grande variété des biotopes sur Terre, les réponses physiologiques aux conditions extrêmes sont observées sur une gamme qui va de la tolérance à l'exigence.

4.1 La thermophilie

La relation des organismes vivants à la température a longtemps été considérée en biologie comme un élément de base de classification. Trois groupes majeurs sont définis selon les températures optimales de croissance (T_{opt}) : les psychrophiles qui ont des T_{opt} inférieures à 20°C, les mésophiles qui poussent de façon optimale entre 20 et 45-55°C et les thermophiles (Figure 9). Traditionnellement, les organismes qui ont une température maximale de croissance T_{max} (i.e. au-dessus de laquelle il n'y a plus de croissance) supérieure à 50°C avaient été décrits comme thermophiles (Madigan *et al.* 2003). Brock (1978) a proposé de fixer la limite de thermophilie au-dessus de 60°C en se basant sur deux arguments : (i) les températures en-dessous de cette limite sont courantes dans la nature alors que des températures plus élevées sont généralement associées à des activités géothermales et industrielles ; (ii) certains invertébrés peuvent survivre à des expositions à des températures proches de 100°C, mais ne peuvent croître au-delà de 50°C (Tableau 6). Le monde thermophile serait alors strictement procaryote. Il est intéressant de noter que la gamme des températures correspondant à la thermophilie couvre la moitié supérieure de l'échelle des températures compatibles avec la vie (Kashefi 2003).

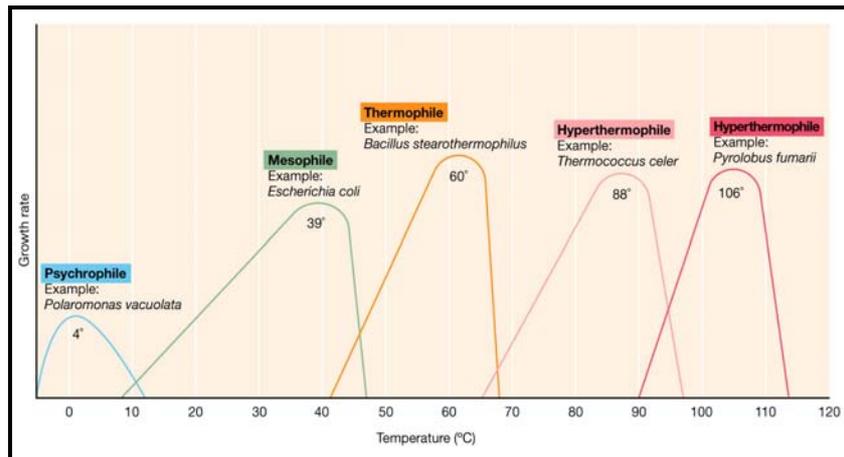


Figure 9 : Effet de la température sur les taux de croissance de microorganismes types : psychrophile, mésophile, thermophile et deux hyperthermophiles différents. Leurs optima de température respectifs sont indiqués sur le graphique (Madigan *et al.* 2003).

Les thermophiles sont encore divisés en deux groupes, du fait de l'extension de la limite supérieure de la vie, à savoir la découverte de l'archée *Pyrolobus fumarii* et la souche 121 qui ont des températures maximales de croissance respectives de 113°C et 121°C (Blöchl *et al.* 1997b, Kashefi 2003). Il est d'usage de classer les microorganismes poussant de façon optimale au-delà de 80-85°C dans le groupe des hyperthermophiles. La plupart des hyperthermophiles appartiennent au domaine des *Archaea*. Au sein des *Bacteria*, peu d'espèces peuvent être qualifiées d'hyperthermophiles ; elles appartiennent aux genres bactériens *Thermotoga* et *Aquifex* (Huber *et al.* 2000c).

Les plus importants biotopes thermophiles naturels, le plus souvent associés à une activité volcanique, sont les sites géothermiques terrestres comprenant des sources chaudes alcalines et les solfatares, et les environnements hydrothermaux marins côtiers et abyssaux. L'étude des microorganismes du « pôle chaud » hydrothermal, complexe et difficile d'accès, est susceptible de nous procurer des réponses sur les conditions limites de la vie (thermophilie, tolérance à l'anoxie et aux composés toxiques etc.), mais également de constituer une source de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique.

Tableau 6 : Températures maximales de croissance des principaux groupes d'organismes (Hobel 2004).

Organismes	T _{max} (°C)	Organismes	T _{max} (°C)
Animaux		Microorganismes eucaryotes	
Poissons	38	Protozoaires	56
Insectes	45-50	Algues	55-60
Crustacées	48-50	Champignons	60-62
Plantes		Procaryotes	
Plantes vascularisées	45	<i>Cyanobacteria</i>	70-72
Bryophytes	50	Bactéries vertes	70-72
		<i>Bacteria</i>	95
		<i>Archaea</i>	121

4.2 Phylogénie des thermophiles

Les microorganismes ont été traditionnellement classés selon des caractères tels que la morphologie et la physiologie, ce qui ne permettait pas d'établir des relations d'évolution entre les différents groupes microbiens. L'introduction de la phylogénie basée sur l'analyse de séquences d'acides nucléiques en systématique microbienne a permis une classification des microorganismes en terme d'évolution et une clarification des lignées phylogénétiques entre elles et des niveaux taxonomiques i.e. espèces, genres, familles etc. (Pace 1997). De plus, les travaux de phylogénie moléculaire sont à l'origine d'une avancée scientifique majeure datant de la fin des années 1970 : la découverte par Carl Woese des *Archaea*, troisième domaine du vivant avec les *Eukarya* et *Bacteria* (Figure 10) (Woese & Fox 1977, Woese *et al.* 1990). Les microorganismes thermophiles sont présents dans les branches les plus profondes de l'arbre du vivant tels qu'il a été proposé par Woese. Ils se situent près du dernier ancêtre commun ou progénote à partir duquel trois lignées ont divergé, correspondant aux trois domaines. Ceci a conduit à l'hypothèse selon laquelle la vie aurait émergé d'environnements chauds.

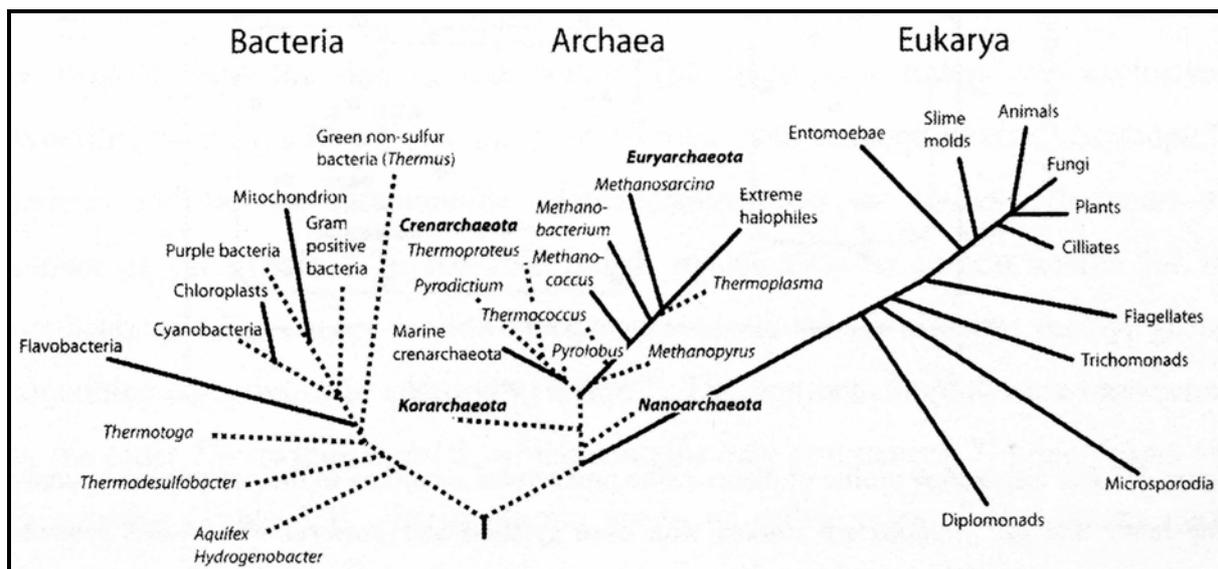


Figure 10 : Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative de séquences de gènes ribosomiques. Ces données soutiennent la discrimination entre les trois domaines, deux d'entre eux contenant des représentants procaryotes (*Bacteria* et *Archaea*). L'enracinement représente la position supposée du dernier ancêtre commun universel. Les groupes phylogénétiques contenant des membres thermophiles ou exclusivement thermophiles sont indiqués en lignes pointillées (d'après Madigan *et al.* (2003), cité par Hobel (2004)).

Les domaines procaryotes *Archaea* et *Bacteria* présentent des caractères phénotypiques communs mais aussi des différences très spécifiques (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractéristiques des *Bacteria* et des *Archaea*.

Caractéristiques	Bacteria	Archaea
Présence d'acide muramique dans la paroi (si présente)	+	-
Lipides membranaires	Acides gras aliphatiques liés au glycérol par des liaisons ester ou ether	Chaînes hydrocarbonées liées au glycérol par des liaisons ether
Premier acide aminé initiant la synthèse d'une chaîne polypeptidique	N-formylméthionine	Méthionine
Endospores	+	-
Présence d'introns dans les gènes	-	+
ARN polymérase eucaryotique	-	+
Coenzymes spéciaux	-	+
Température maximale de croissance	95°C	121°C
Photosynthèse complète	+	-
Méthanogénèse	-	+
Cycle de Calvin (fixation du CO ₂)	+	-

Les espèces archéennes et bactériennes thermophiles isolées des sources hydrothermales océaniques profondes sont présentées dans les tableaux 4 et 5 (paragraphe 1.4).

4.3 Bases moléculaires de la thermophilie

L'étude de la vie à haute température est relativement récente, et malgré l'ensemble des connaissances acquises depuis une vingtaine d'années, les mécanismes moléculaires d'adaptation à la thermophilie reste à ce jour peu connus. Tous les composants cellulaires des microorganismes thermophiles doivent être adaptés, ou du moins résistants, aux températures élevées. Ceci implique que non seulement les protéines soient stables à des températures supérieures à 80°C, mais aussi les lipides, les acides nucléiques et les métabolites de faible poids moléculaire.

4.3.1 Les lipides

L'étude de la composition des lipides membranaires indiquent des différences d'adaptation à la thermophilie entre les archées et les bactéries. Les lipides membranaires des archées comportent des liaisons éther alors que ces liaisons sont généralement de type ester chez les bactéries et les eucaryotes. Toutefois, un nouveau type de lipide de glycérol à liaison éther a été identifié chez la bactérie hyperthermophile *Thermotoga maritima* : l'acide 15,16-diméthyl-30-glyceryloxy-triacontanedioïque. Les liaisons éther sont plus résistantes que les liaisons ester aux effets de la température, à l'oxydation et à la dégradation enzymatique. De plus, les archées possèdent des tétraéthers de diphytanyl-glycérol : les deux chaînes d'acides gras (phytanyl) issues de chaque molécule de glycérol sont liées par

des liaisons covalentes créant une structure membranaire en monocouche lipidique (Figure 11). Cette structure, largement répandue chez les archées hyperthermophiles, est beaucoup plus rigide que les bicouches lipidiques des bactéries (Van de Vossenberg *et al.* 1998). Les stratégies de conservation de la structure membranaire à température élevée impliquent chez les bactéries une augmentation du degré de saturation et de la longueur des chaînes d'acides gras, et chez les archées une cyclisation des chaînes d'acides gras et une transition de lipides à liaison diéther en lipides à liaison tétraéther, ce qui contribue à une meilleure adaptation aux températures élevées par réduction de la fluidité membranaire.

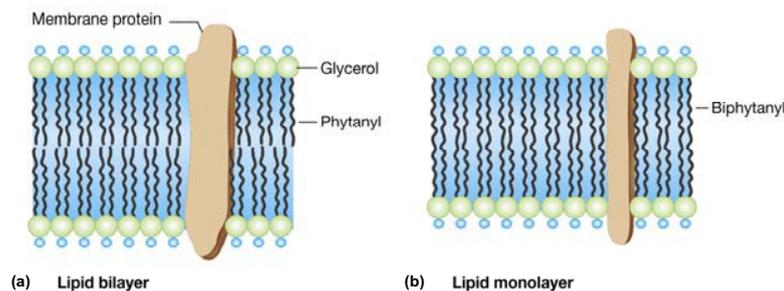


Figure 11 : Structure membranaire des *Archaea*. (a) bicouche lipidique contenant des diéthers de glycérol, (b) monocouche lipidique contenant des tétraéther de glycérol (Madigan *et al.* 2003).

1.1.1 Les acides nucléiques

Les archées hyperthermophiles possèdent une gyrase inverse, l'ADN topoisomérase de type I qui introduit des super-tours positifs dans l'ADN ce qui contribue à stabiliser la double hélice d'ADN et à la préserver de la dénaturation thermique (Forterre *et al.* 1989). Les gyrases inverses ont été détectées uniquement chez les microorganismes qui ont une température optimale de croissance de plus de 65°C, et sont présentes sans exception chez les archées et les bactéries dont les températures optimales de croissance sont supérieures à 80°C. Ce super-enroulement pourrait maintenir les paramètres structuraux et thermodynamiques de l'ADN à des valeurs similaires à celles des mésophiles (Forterre *et al.* 1996). D'autres protéines sont connues pour participer au maintien à forte température de la structure double-brin de l'ADN. Certaines, pouvant être homologues aux histones des eucaryotes, compactent l'ADN en des structures qui rappellent les nucléosomes. Les mécanismes de thermoadaptation des hyperthermophiles incluent également des modifications nucléotidiques des ARN de transfert qui ont des structures secondaires stabilisées et des températures de fusion plus élevées. Un contenu élevé en bases G+C des ARN de transfert et des ARN ribosomiques pourrait stabiliser les conformations actives (Woese *et al.* 1991). Concernant l'ARN simple-brin, certaines liaisons induisant sa structure secondaire sont renforcées par des modifications post-transcriptionnelles des bases

impliquées. Enfin, des concentrations intracellulaires élevées en solutés variés, sels, polyamines, et protéines à bas poids moléculaire qui se lient à l'ADN ont été observées dans le cytoplasme de certains hyperthermophiles. Le 2-3 diphosphoglycérate de potassium sous forme cyclique est un soluté détecté dans le cytoplasme de méthanogènes hyperthermophiles. Il protège l'ADN des modifications chimiques apparaissant à forte température telles que la dépurination (Madigan *et al.* 2003). Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont présumés avoir des mécanismes de réparation de l'ADN particulièrement efficaces. Les détails de ces mécanismes sont pourtant jusqu'à présent inconnus.

4.3.3 Les protéines

Il semble qu'il n'existe pas de mécanisme universel expliquant la thermostabilité des protéines chez les microorganismes thermophiles, mais plutôt plusieurs facteurs intervenant à différents niveaux selon le microorganisme considéré. La composition en acides aminés des protéines thermostables issues d'hyperthermophiles ne présente pas de particularités notables. Les enzymes classiques sont inactivées souvent de façon irréversible à des températures supérieures à 60°C par la désorganisation de leur structure tertiaire, tandis qu'un grand nombre d'enzymes issues de microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles sont stables et actives à des températures largement supérieures à la température maximale de croissance de l'organismes d'origine (Sternier & Liebl 2001). La désamination des chaînes latérales des acides aminés glutamine et asparagine et les clivages des ponts dissulfures apparaissent au-delà de 80°C. Le repliement des protéines semble être un facteur essentiel de thermostabilité. Certaines propriétés communes aux protéines thermostables ont été observées :

- une faible surface d'exposition aux solvants,
- une augmentation de l'hydrophobicité du centre de la protéine, ce qui diminue probablement le risque de dépliement,
- une augmentation de la densité de l'enzyme repliée, permettant de diminuer les cavités du centre hydrophobe,
- une diminution de la longueur des boucles superficielles,
- la présence de liaisons hydrogènes entre les résidus polaires, et davantage de liaisons ioniques en surface.

C'est finalement le repliement de la protéine qui conditionne la résistance aux températures élevées. Ainsi, des changements mineurs dans la séquence primaire d'acides aminés sont apparemment suffisants pour qu'une protéine thermolabile devienne thermostable. L'adaptation des protéines aux températures extrêmes semble être le résultat d'un compromis entre la rigidité permettant la thermostabilité et la flexibilité nécessaire à la

fonction physiologique. Comme toutes les cellules, les hyperthermophiles produisent des protéines chaperonnes qui participent au repliement des protéines partiellement dénaturées. Une protéine chaperonne appelée *thermosome* a été caractérisée chez *Methanopyrus kandleri* (Andrä *et al.* 1996) et également détectée chez *Pyrodictium fumarii* et *Pyrodictium occultum*. Cette protéine participe au maintien de la structure et de la fonction des autres protéines intracellulaires, et contribue ainsi à la survie des cellules à des températures supraoptimales. A 108°C, les protéines solubles d'un extrait brut de *Pyrodictium occultum* contiennent près de 80% de thermosome. Il a été montré que des cellules de *P. occultum* et *P. fumarii* peuvent survivre 1 h dans l'autoclave (121°C – 2 bars) (Blöchl *et al.* 1997b, Stetter 1999). Aux températures maximales de croissance, le rôle des protéines de choc thermique (HSP) semble être essentiel. Il a été montré qu'une protéine HSP issue de l'hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* pouvait empêcher l'agrégation des protéines de la bactérie mésophile *E. coli* exposée 40 min à 105°C (Laksanalamai *et al.* 2001). Enfin, une accumulation très inhabituelle de solutés compatibles tels que le di-myo-inositol-phosphate ou le mannosylglycérate a été mise en évidence chez des archées et bactéries thermophiles et hyperthermophiles (*Thermotoga maritima* (Ramakrishnan *et al.* 1997), *Pyrococcus woeisi* (Scholz *et al.* 1998)), et n'ont jamais été identifiés chez des organismes mésophiles. Il a été montré *in vitro* que ces deux composés pouvaient jouer un rôle de thermoprotecteurs sur des protéines cytoplasmiques. Certains solutés compatibles sont également impliqués dans l'ajustement osmotique. La nature des solutés compatibles intracellulaires dépend de la phase de croissance et de la composition du milieu de culture (Lamosa *et al.* 1998). Le mode d'action de ces composés, d'intérêt fondamental et appliqué, reste à élucider (Santos & Da Costa 2002).

Outre la thermostabilité des macromolécules, la thermostabilité de métabolites à faible poids moléculaire et de coenzymes pourrait être un facteur qui régit les limites supérieures de température pour la croissance des hyperthermophiles. A des températures de l'ordre de 100°C, des acides aminés thermolabiles tels que la cystéine et l'acide glutamique sont détruits et l'ATP et le NAD⁺, coenzymes utilisés par les archées hyperthermophiles, sont instables. La durée de demi-vie de l'ATP et du NAD⁺ est inférieure à 30 min à 120°C et diminue fortement pour des températures supérieures (Madigan *et al.* 2003). Les stratégies microbiennes mises en œuvre pour surmonter cette instabilité sont inconnues. La survie des organismes se développant à ces températures pourrait être assurée par une re-synthèse rapide des composés thermo-sensibles. Outre la stabilité des biomolécules, la perméabilité membranaire aux protons doit être maintenue à un niveau suffisant pour assurer le gradient électrochimique de protons et ainsi le gain d'énergie. Le séquençage complet de plusieurs génomes d'archées et de bactéries hyperthermophiles

ouvre la voie pour la recherche de déterminants génétiques de l'hyperthermophilie (Makarova *et al.* 2003).

La limite supérieure de la vie n'a probablement pas été atteinte et pourrait se situer aux alentours de 140-150°C, en supposant que les réactions chimiques telles que les réparations moléculaires et la synthèse de biomolécules thermo-sensibles ne peuvent avoir lieu au-delà de ces températures (Cowan 2004). L'ATP étant instable à 150°C, si des "super"hyperthermophiles capables de croissance à ou au-delà de 150°C étaient découverts, ils révéleraient probablement de nouveaux principes fondamentaux en biologie et biochimie. Puisque la vie telle que nous la connaissons est essentiellement dépendante de la présence d'eau sous forme liquide, les habitats microbiens supérieurs à 100°C n'existent que dans des environnements hyperbares. De plus, il est probable que la pression stabilise de nombreuses protéines hyperthermophiles *in vivo*, à des températures supérieures à leur température optimale (Holden & Baross 1995). Les écosystèmes hydrothermaux marins profonds constituent dès lors un milieu idéal pour tenter de découvrir et cultiver de nouveaux microorganismes qui repousseraient la température maximale de croissance compatible avec la vie.

4.4 Applications biotechnologiques des micro-organismes marins thermophiles

Outre l'aspect fondamental présenté par les nouvelles souches thermophiles et hyperthermophiles, ces microorganismes sont susceptibles de contenir des molécules d'intérêt biotechnologique pour les procédés se déroulant à haute température. Le marché des enzymes et des composés organiques issus d'organismes extrêmophiles est estimé à 17 milliards de dollars. Les enzymes thermostables arrivent au premier rang des molécules d'intérêt biotechnologique. Les activités thermostables d'hydrolyse de composés protéiques, lipidiques et glucidiques sont principalement recherchées. Une température élevée augmente la biodisponibilité et la solubilité des composés organiques, et abaisse la viscosité. De nombreux procédés industriels comportent des étapes enzymatiques réalisées à des températures supérieures à 60°C. C'est le cas de la production de glucose et de fructose à partir d'amidon (activités amylases), des procédés de blanchiment de la pâte à papier faisant intervenir des xylanases, ou du blanchiment des *jeans* (cellulases). L'hydrolyse des lipides à haute température par des hydrolases thermostables permet entre autres d'opérer en phase liquide. Ces enzymes issues de microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles tardent à être exploitées dans les procédés industriels, car elles ne répondent pas exactement aux besoins industriels ou que leur substitution aux enzymes classiques est trop coûteuse. Ces enzymes sont par contre largement employées en biologie moléculaire. Certaines font l'objet de brevets et sont commercialisées : c'est le cas de plusieurs ADN polymérases hyperthermostables utilisées dans la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) (*Tfu*

Pol issue de *Thermococcus fumicolans*, Pab Pol issue de *Pyrococcus abyssi* : Isis[®]), d'une phosphatase alcaline utilisée en immuno-marquage, et d'une ADN ligase qui sont issues de souches hydrothermales océaniques.

Des souches hyperthermophiles soufre-réductrices telles que *Thermococcus hydrothermalis*, issue de l'écosystème hydrothermal océanique, ont permis la caractérisation de plusieurs enzymes présentant un intérêt industriel potentiel : une alcool deshydrogénase NADPH group III (Antoine *et al.* 1999), une pullulanase (Gantelet & Duchiron 1998), une α -amylase (Leveque *et al.* 2000). La production d'enzymes natives issues de microorganismes hyperthermophiles soufre-réducteurs nécessite la maîtrise de techniques de fermentation adaptées. Parmi les différents procédés développés, le gas-lift permet de cultiver de telles souches en l'absence de soufre grâce à une élimination des gaz produits, en particulier le H₂ toxique pour la croissance (Raven *et al.* 1992). Les risques de contamination par des microorganismes mésophiles sont limités dans le cas de cultures en continu à des températures supérieures à 60°C.

5 Méthodes pour décrire et accéder à la diversité microbienne

Le maintien de la biosphère dépend en particulier des processus microbiens qui sont à la base de la vie sur Terre. L'analyse de la diversité microbienne est d'importance pour (i) augmenter nos connaissances de la diversité des ressources génétiques issues des communautés microbiennes, (ii) comprendre la distribution des microorganismes, (iii) améliorer nos connaissances du rôle fonctionnel des communautés microbiennes, (iv) et ainsi comprendre la régulation de la biodiversité, et estimer dans quelle mesure le maintien de la fonction et la pérennité d'un écosystème dépendent du maintien d'un certain niveau de diversité génétique.

5.1 Taxonomie et définition d'espèce

L'espèce constitue l'unité de base de la classification bactérienne. La définition classique d'une espèce biologique (communauté d'êtres vivants reconnaissables par leurs caractères et capables de se reproduire sexuellement entre eux en donnant naissance à une progéniture fertile) n'est pas applicable aux procaryotes car (i) les critères morphologiques ont peu d'intérêt du fait de la simplicité morphologique des bactéries et (ii) la reproduction des procaryotes est végétative et asexuée ce qui rend le critère d'interfécondité inapplicable. En microbiologie, une espèce est constituée par sa souche type et par l'ensemble des souches considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluses au sein de la même espèce. Les critères permettant d'apprécier la parenté de différentes souches ont varié dans le temps et il est possible de distinguer quatre grandes périodes au cours desquelles ont été utilisées une taxonomie phénétique, une taxonomie numérique, une taxonomie phylogénétique et une taxonomie polyphasique encore qualifiée de "mixte et consensuelle" (polyphasic taxonomy). La définition de l'espèce diffère selon les critères retenus pour apprécier la similitude des souches ce qui a conduit à constituer des comités internationaux chargés de définir les critères et de proposer une définition de l'espèce (Stackebrandt *et al.* 2002, Wayne *et al.* 1987).

Taxonomie phénétique

Les premières classifications bactériennes basées sur la comparaison de critères morphologiques datent de la fin du XIX^{ème} siècle. Jusqu'au début des années 1960, la définition d'une espèce, et d'une manière générale toute la taxonomie bactérienne, reposait sur une classification phénétique ou phénotypique. Cette classification utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la mise en évidence d'un caractère biochimique jugé essentiel, l'habitat, le pouvoir pathogène etc. Le choix des critères qualifiés "d'importants" est subjectif et il peut varier d'un auteur à un autre.

Taxonomie numérique

En 1763, le botaniste français Adanson proposait une méthode de classification qui tenait compte de l'ensemble des caractères d'un organisme. A la fin des années 1950, suite au développement des techniques biochimiques analytiques, Sneath applique une méthode similaire aux bactéries et développe une taxonomie qualifiée de numérique ou d'adansonienne. De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques etc. et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Les degrés de similitudes entre individus sont finalement représentés sous la forme de dendrogramme, et permettent de rassembler dans une même classe de similitude les individus les plus semblables.

Les caractères métaboliques et physiologiques sont dès lors largement employés en taxonomie, même s'il est bien connu que ces caractères peuvent être différents pour des souches d'une même espèce. Cette variabilité peut être expliquée aujourd'hui par les transferts de plasmides et les transferts de gènes *via* les phénomènes de parasexualité tels que la conjugaison, la transformation et la transduction qui sont connus chez les procaryotes, et qui passent la barrière d'espèce, voire même de domaine (Nelson *et al.* 1999). Les cas d'échanges de gènes métaboliques ou de gènes impliqués dans l'adaptation à l'environnement ont été rapportés.

Taxonomie phylogénétique

Dès 1936, Kluyver et Van Niel proposaient l'utilisation d'une taxonomie phylogénétique. L'établissement de relations de parenté apparaissait comme nécessaire à la mise en place d'une systématique pertinente. Il fallut attendre la deuxième moitié du 20^{ème} siècle pour que les outils nécessaires au développement d'une telle taxonomie soient disponibles et qu'une taxonomie phylogénétique commence à se mettre en place.

a) Détermination du G + C %

En 1949, Chargaff *et al.* montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier d'un individu à un autre mais était constant pour les individus d'une même espèce. Le contenu en base d'un ADN est exprimé par le G+C %. Chez les bactéries, cette valeur est très dispersée et varie de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des microorganismes dont les G+C% diffèrent de plus de 5% ne peuvent appartenir à une même espèce, et que des microorganismes dont le G+C% diffèrent de plus de 10% ne peuvent appartenir au même genre. Bien entendu, des valeurs identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être distribuées de manière très différente sur l'ADN.

b) Les hybridations d'acides nucléiques

Les hybridations ADN/ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne. Leurs réalisations n'ont été possibles qu'après la découverte du phénomène de renaturation de l'ADN (Marmur & Doty 1962). Les méthodes d'hybridation ADN/ADN sont basées sur le fait que deux molécules d'ADN dénaturées peuvent se réassocier à condition de présenter une homologie. La renaturation est réalisée à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. Dans ces conditions, on obtient d'autant plus de duplex hétérologues que les séquences d'ADN des micro-organismes sont proches. Cette technique présente plusieurs avantages :

- . elle est applicable à toutes les espèces cultivables ;
- . les résultats ne sont pas ou peu affectés par les mutations ou par la présence de plasmides;
- . elle porte sur l'ensemble du génome (plasmides exceptés).

Une espèce est définie phylogénétiquement comme l'ensemble des souches ayant des valeurs d'hybridation ADN/ADN supérieures ou égales à 70 % et des valeurs de ΔT_m inférieures ou égales à 5°C (T_m : melting temperature, c'est la température de demi-dénaturation d'un homo ou d'un hétéroduplex d'ADNs ; ΔT_m : différence de T_m entre l'hybride homologue et l'hybride hétérologue). Si ce critère de définition d'une espèce bactérienne était appliquée aux mammifères, l'homme et le chimpanzé constitueraient une unique espèce : 98,4% d'homologie ADN/ADN ; et il en irait de même pour l'homme et les lémuriers : 78% d'homologie ADN/ADN.

c) Etude des ARN ribosomaux

En 1983, Kimura a émis le concept d'horloge "évolutionnaire" : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Comme le souligne Woese, l'évolution a un rythme quasi indépendant des changements de phénotypes (théorie neutraliste de l'évolution). Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique ou phylogénétique en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles. La généralisation de l'analyse des séquences d'ADNr 16S a incité les auteurs à corréliser les pourcentages d'identité entre séquences d'ADNr 16S et les pourcentages de réassociations ADN/ADN. Il a ainsi été mis en évidence que des séquences d'ADNr 16S ayant des similarités inférieures à 97% ne correspondaient jamais à des pourcentage de réassociation ADN/ADN supérieurs à 60% (Stackebrandt & Goebel 1994). Par extension, il est généralement admis que des séquences partageant moins de 97% de similarité correspondent à des espèces différentes. Le pouvoir résolutif de l'ADNr 16S, *a priori* suffisant pour séparer des espèces différentes, ne permet pas toutefois de regrouper des espèces identiques. Si le pourcentage de similarité des ADNr

16S de deux souches est égal ou supérieur à 97, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN/ADN. Dès lors, la définition d'espèce ne peut être basée uniquement sur la base de similarité de séquences d'ADNr 16S ou même d'autres gènes (Rossello Mora & Amann 2001). Il existe beaucoup d'exemples d'espèces différentes ayant pourtant des séquences d'ADNr 16S identiques ou quasi-identiques. A l'inverse, le nombre de copies de l'opéron *rrn* est variable d'un organisme à l'autre et les gènes codant pour les ARNr 16S peuvent présenter une microhétérogénéité au sein des différents opérons *rrn* d'une même espèce (<1% pour la grande majorité, mais jusqu'à 11.6% pour *Thermoanaerobacter tengcongensis* (Acinas et al. 2004)).

Taxonomie mixte et consensuelle

Les termes de "polyphasic taxonomy" ont été introduits en 1970 par Colwell pour faire référence à une classification qui tient compte d'un maximum de données : données génétiques, données phénotypiques, données écologiques... En effet, aucun des critères utilisé isolément n'est suffisamment discriminant pour classer les taxons les uns par rapport aux autres. De nos jours, l'expression "polyphasic taxonomy" sous-entend également que cette classification est susceptible d'avoir l'agrément d'un maximum de bactériologistes d'où la traduction "taxonomie mixte et consensuelle" (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/genomo-species.html>).

La définition d'une espèce, telle quelle est donnée par le Comité présidé par Wayne puis reprise par le Comité présidé par Stackebrandt, repose entre autres sur la comparaison des critères phénotypiques, des séquences d'ADNr 16S et se base sur la valeur seuil des 70% d'homologie ADN/ADN. Selon le comité, la description d'une nouvelle espèce devrait reposer sur la description de plusieurs souches et le développement de nouvelles techniques est recommandé : le séquençage de gènes différents, en particulier de gènes codant pour des protéines du métabolisme, afin de vérifier la cohérence génomique d'un cluster ; le séquençage de l'espace intergénique 16S-23S ; l'analyse électrophorétique des protéines etc.

Une revue récente propose de définir l'espèce comme étant "un cluster monophylétique et génomiquement cohérent d'organismes individuels présentant un niveau de similitude globalement élevé pour de nombreuses caractéristiques indépendantes, et détectable par une propriété phénotypique discriminante" (Rossello Mora & Amann 2001).

En dépit de ces efforts, il convient de remarquer qu'il n'existe actuellement aucune définition universellement admise de l'espèce bactérienne, la notion d'espèce chez les procaryotes relèverait plutôt de l'ordre du concept (Stackebrandt 2003).

5.2 L'approche culturelle

5.2.1 Méthode traditionnelle d'enrichissement et d'isolement

La mise au point de techniques pour réaliser des cultures pures par Koch et Petri à la fin du 19^{ème} siècle a constitué une étape importante en microbiologie par la mise en place des outils nécessaires au développement de la taxonomie bactérienne, de la génétique microbienne et des disciplines associées.

L'étude de la diversité microbienne consiste traditionnellement à cultiver des microorganismes par enrichissement puis isolement avant l'identification de leurs caractères phénotypiques. Le milieu et les conditions d'incubation utilisées pour l'enrichissement peuvent être électifs (= peu sélectifs) ou sélectifs pour l'obtention de microorganismes aux phénotypes particuliers. On favorise dans tous les cas la croissance des microorganismes les plus adaptés aux conditions choisies.

Les cultures d'enrichissement servent d'inoculum pour l'isolement qui est classiquement réalisé par étalement sur milieu solide, ou par dilutions successives en milieu liquide ou dans de l'agar. Chaque étape est généralement contrôlée grâce à des observations microscopiques.

Plusieurs caractères phénotypiques et génotypiques sont utilisés pour la classification des microorganismes. L'essor de la phylogénie moléculaire et la standardisation des techniques désormais utilisées en routine ont permis une clarification dans la classification et la définition des taxons (paragraphe 5.1).

5.2.2 Stratégies originales d'enrichissement et d'isolement

Les étapes d'enrichissement et d'isolement sont des étapes nécessaires pour accéder aux caractéristiques phénotypiques. Toutefois les techniques de culture ne permettent d'accéder qu'à un nombre limité des espèces présentes dans un écosystème. Ceci est particulièrement vrai pour des écosystèmes complexes comme le sol ou les boues qui contiendraient de 1000 à 10000 espèces différentes (Torsvik *et al.* 1990). Il a été fréquemment rapporté que les comptages directs en microscopie dépassaient de plusieurs ordres de grandeur le nombre de cellules viables dénombrées (Tableau 8). Par conséquent, selon les auteurs, il est généralement admis que 0.001 à 15% des microorganismes existant sont actuellement cultivables, bien que des différences évidentes apparaissent selon l'écosystème considéré.

Tableau 8 : Pourcentage de microorganismes cultivables au sein de différents types d'habitats (d'après Amann *et al.* (1995)).

Habitats	Microorganismes cultivables (%) ^a
Eau de mer	0,001-0,1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1-1
Eaux d'estuaires non polluées	0,1-3
Boues actives	1-15
Sédiments	0,25
Sol	0,3

^a nombre de microorganismes formant des colonies (UFC) sur boîte de Petri rapporté au nombre total de microorganismes dénombrés par microscopie dans l'échantillon.

L'énorme difficulté à cultiver et isoler de nouveaux microorganismes est directement liée aux conditions de croissance *in vitro* qui s'avèrent par définition hautement artificielles. De nombreux biais limitent la capacité de culture des microorganismes, parmi eux :

- la sélectivité intrinsèque de n'importe quel milieu de culture dans des conditions données : des populations minoritaires numériquement peuvent supplanter des populations majoritaires dans l'échantillon environnemental mais inadaptées aux conditions de culture,
- l'inhibition de la croissance en raison de concentrations élevées des substrats (exemple des microorganismes oligotrophes),
- des populations enrichies en milieu liquide peuvent être incapables de croissance sur milieu solide,
- des dilutions éventuelles de l'inoculum utilisé pour l'enrichissement peuvent influencer le type de microorganismes cultivés,
- l'induction de phages lytiques,
- l'absence de communication inter-cellulaire dans les milieux de culture traditionnels : des microorganismes symbiotes ou syntrophes ne pourront être obtenus en culture pure,
- des dommages cellulaires (ex : stress oxydatif déclenchant le système de réponse SOS),
- un état physiologique des cellules connu sous le nom de "viable mais non-cultivable" : l'étude de la survie de bactéries a indiqué que certains organismes perdaient leur cultivabilité sur milieu approprié mais présentaient toujours des signes d'activité métabolique, et donc de viabilité. L'état "viable mais non-cultivable" pourrait être une réponse programmée à un stress environnemental (changements de température, de salinité, de disponibilité des nutriments etc.) mais les bases moléculaires et physiologiques qui régissent l'entrée et la sortie des cellules en état "viable mais non-cultivable" sont encore incompréhensibles (McDougald *et al.* 1998),

- la séparation de microorganismes différents et cependant capables de croissance dans des conditions similaires peut être difficile.

La difficulté principale est de reproduire ou du moins d'imiter au laboratoire les conditions de l'habitat dont proviennent les échantillons obtenus. Récemment, la culture des microorganismes a connu un nouvel essor avec un intérêt croissant pour le développement de techniques de culture alternatives ayant pour objectif de cultiver des microorganismes plus spécialisés, et de cultiver de nouveaux microorganismes (Leadbetter 2003).

Ces nouvelles techniques de culture tendent pour la plupart à simuler au mieux les conditions de l'environnement notamment en terme de disponibilité des nutriments. Ces méthodes peuvent impliquer une composition des milieux plus proche des conditions *in situ*, notamment en réduisant considérablement les concentrations en nutriments. Certaines techniques de culture en continu, très prometteuses, permettent un apport permanent des nutriments et la possibilité de maintenir les cultures sur de longues périodes. Quelques exemples sont présentés ci-dessous.

➤ Des stratégies d'enrichissement utilisant une **variété d'accepteurs et de donneurs d'électrons**, en particulier d'ions métalliques, ont permis d'isoler de nouveaux microorganismes présentant des phénotypes très particuliers (pour revue, voir Leadbetter 2003). L'utilisation de faibles, voire très **faibles concentrations en nutriments**, peut aussi être une stratégie efficace pour augmenter la diversité microbienne au sein des cultures d'enrichissement.

- Des enrichissements ont été réalisés à partir d'échantillons de sources chaudes riches en sulfures (Islande) en utilisant de faibles concentrations d'amidon afin de cultiver des microorganismes à croissance lente capables de dégrader l'amidon. Les 17 phylotypes bactériens détectés par analyse des séquences d'ADNr 16S étaient affiliés aux groupes *Thermus-Deinococcus*, aux bactéries vertes non-sulfureuses, à des bactéries Gram-positif et à des divisions candidates non-cultivées. La diversité des séquences d'ADNr 16S issues des enrichissements était très différente de celle des tapis microbiens issus de la même source d'eau chaude. Le criblage par PCR de gènes codant pour des amylases a permis la détection de 18 séquences-types d'amylases dans les enrichissements. L'utilisation de faibles concentrations de nutriments dans les enrichissements et les méthodes moléculaires ont ainsi permis d'accéder à une diversité de gènes dits "silencieux", i.e. jusqu'à présent "non-détectés" dans l'environnement (Hobel 2004).

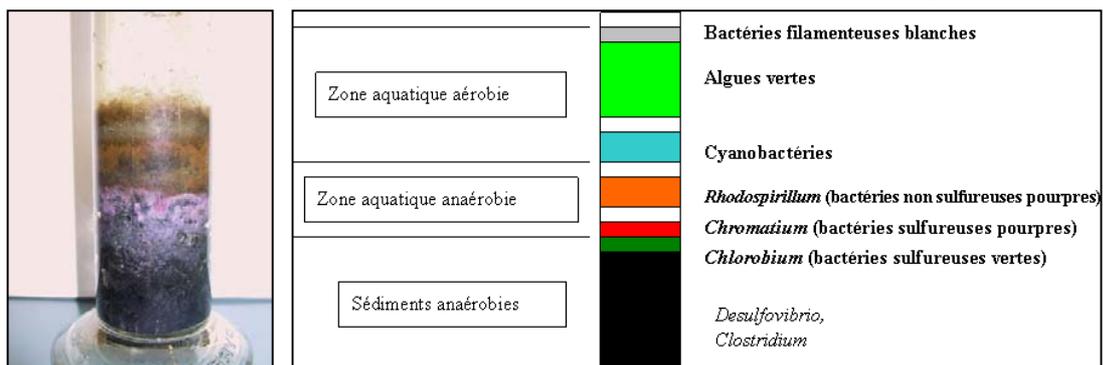
- Une stratégie de culture à haut débit a été développée pour tenter de cultiver des membres jusque là incultivés d'écosystèmes marins oligotrophes, impliquant la réalisation d'un grand nombre de cultures dans des petits volumes de milieu pauvre en nutriments (1 mL). L'apport des substrats à des concentrations similaires à l'environnement *in situ* (environ 3 ordres de

grandeur de moins que les milieux classiques de laboratoire) a permis de cultiver jusqu'à 14% des cellules d'un échantillon d'eau de mer côtier par cette méthode, soit 14 à 1400 fois plus que par des techniques de culture traditionnelles d'après les auteurs (Connon & Giovannoni 2002).

- Afin de se rapprocher au mieux des conditions *in situ*, les milieux de culture peuvent par exemple contenir de l'eau directement prélevée sur le site d'échantillonnage. Idéalement, les expériences devraient être menées directement *in situ*, par réalisation de cultures d'enrichissement ou colonisation de substrats. Dans ce dernier cas, des matrices riches en nutriments ou des supports artificiels de nature variable peuvent être employés comme support de colonisation (Hobel 2004, Hobel *et al.* 2004).

➤ Des **systèmes de culture élaborés** ont parfois été mis en œuvre pour cibler la croissance de microorganismes issus d'écosystèmes complexes. C'est le cas notamment des milieux à forts gradients (physico-chimiques, nutritionnels, etc.) pour lesquels des systèmes particuliers, tels que la colonne de Winogradsky (Figure 12), ont été mis au point. Cette colonne a été mise au point à la fin du 19^e siècle pour cultiver les microorganismes du sol. La phase supérieure de la colonne reproduit les conditions du milieu liquide (eau de lac ou de marais) en terme de luminosité et d'aération, alors que la phase inférieure reproduit les conditions des premiers centimètres de sédiments en terme d'obscurité et d'augmentation du potentiel réducteur. L'établissement des microorganismes s'effectue au cours du temps en fonction de leur préférence au sein des gradients (Madigan *et al.* 2003).

Figure 12 : Colonne de Winogradsky (<http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/Winogradsky.html>)



➤ D'autres méthodes impliquent des **systèmes de cultures en continu**. La culture en continu implique le lessivage des microorganismes présentant une affinité insuffisante pour les substrats.

- Huber *et al.* ont réussi à cultiver la bactérie hyperthermophile chimiolithoautotrophe *Thermocrinis ruber* grâce à la mise au point d'une chambre de culture en continu, dans

laquelle un balayage constant à l'oxygène semblait nécessaire à la croissance du microorganisme (Figure 13) (Huber *et al.* 1998).

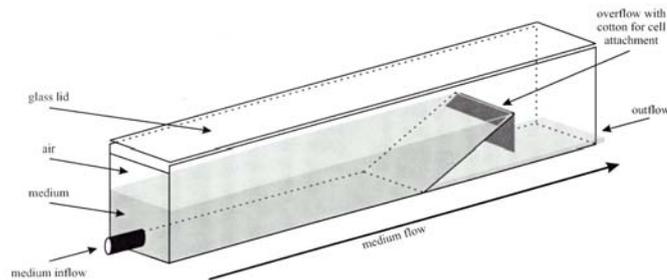


Figure 13 : Chambre de culture (160 x 20 x 20 mm) utilisée pour l'étude de *Thermocrinis ruber*. Les constituants (plaques) en verre sont reliés par des joints en silicone (Huber *et al.* 1998).

- Un système de culture en continu a permis l'isolement et la caractérisation d'une bactérie capable d'oxyder les sulfures et de produire des filaments de soufre comme produit final de son métabolisme. Cette bactérie du genre *Arcobacter* (ϵ -*Proteobacteria*) a été isolée à partir d'un échantillon marin côtier grâce à l'établissement d'un gradient de sulfures d'hydrogène et d'oxygène dans une culture en continu au sein d'un bioréacteur (Figure 14) (Taylor *et al.* 1999, Wirsén *et al.* 2002).

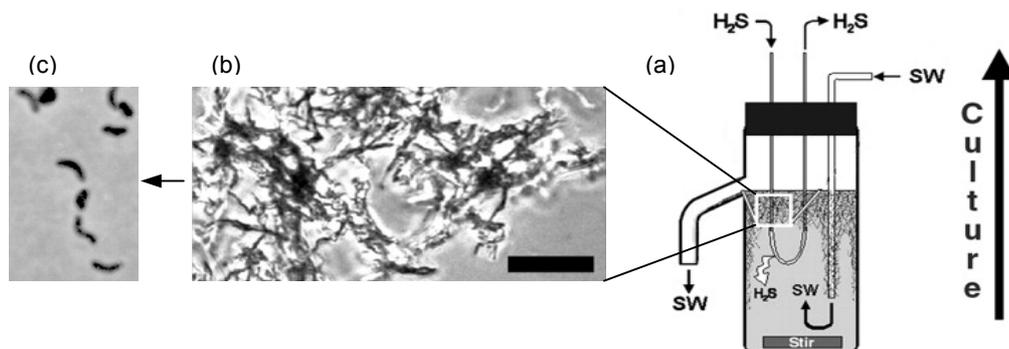


Figure 14 : (a) Schéma du système de culture en continu utilisé pour la croissance de microorganismes hydrothermaux producteurs de filaments de soufre (SW: eau de mer oxygénée). (b) microphotographies de filaments de soufre produits dans la culture, barre = 10 μ m, et (c) de microorganismes issus de la culture en bioréacteur (Taylor, *et al.* 1999).

- La mise en oeuvre d'une culture d'enrichissement en continu à 85°C a permis de cultiver des membres du phylum archéen '*Korarchaeota*', ne comportant jusque là aucun représentant cultivé. La culture a été réalisée en continu pendant une année, en anaérobiose et à 85°C, à partir d'échantillons d'eau et de sédiments de Yellowstone (Burggraf *et al.* 1997).

- Dans une étude de 2003 (Wery *et al.* 2003), l'utilisation d'un bioréacteur a permis de cultiver en aérobiose à 10°C des microorganismes issus d'un échantillon de sol de

l'Antarctique, dans un but d'isolement de souches productrices de protéases. Le bioréacteur rempli de billes de verre non-poreuses a été alimenté par un milieu contenant 0.01% de caséine. Après inoculation, une circulation du milieu a été établie pendant les 10 premiers jours permettant la colonisation microbienne. Pendant les 15 jours suivants, du milieu frais a été apporté en continu. 75 souches hétérotrophes ont été isolées sur boîte, sur un milieu gélosé contenant du lait en poudre. 28 d'entre elles, principalement psychrotrophes, ont été partiellement caractérisées. L'analyse des séquences d'ADNr 16S de ces souches a permis la mise en évidence d'une large diversité bactérienne : des α , β et γ -*Proteobacteria*, des membres du groupe *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, des bactéries à Gram-positif à bas et haut G+C%. La diversité obtenue confirme que l'utilisation du bioréacteur dans cette étude est efficace comparée aux stratégies d'isolement traditionnelles.

- Des archées méthanotrophes anaérobies ont été récemment identifiées dans des sédiments marins anoxiques, mais n'ont pu être obtenues à ce jour en culture pure. L'intérêt est croissant pour ces archées méthanotrophes en association syntrophique avec des bactéries sulfato-réductrices qui font l'objet d'un grand nombre d'études. Pour tenter d'obtenir en culture ces consortia microbiens, la mise au point d'un système de culture en continu a été récemment décrit (Girguis *et al.* 2003). Comparé à des systèmes expérimentaux statiques tels que les flacons sérum, le système AMIS (Anaerobic Methane Incubation System) permet une simulation de la majorité des conditions *in situ* qui fluctuent constamment. Des sédiments marins prélevés au niveau de suintements froids riches en méthane du Canyon de Monterey (profondeur 955m, Calif., USA) ont été incubés 24 semaines à 5°C dans le système AMIS. Le réacteur a été alimenté en eau de mer filtrée pour mimer la composition des fluides, et balayé par un mélange gazeux composé de méthane, sulfures d'hydrogène et azote. La croissance et l'activité métabolique d'archées méthanotrophes anaérobies (et vraisemblablement de bactéries sulfato-réductrices syntrophiques) a été démontrée par analyses physiologiques (mesure du taux d'oxydation du méthane) et moléculaires (diversité des ARNr 16S archéens, PCR quantitative, FISH). La culture de microorganismes en consortium permet ainsi d'examiner des processus qui ne sont pas régis par des microorganismes appartenant à un seul phénotype.

- Une nouvelle approche d'enrichissement et d'isolement combine un apport de milieu en flux continu et une faible concentration des nutriments. Les cellules sont isolées par encapsulation dans un gel, puis incubées sous un flux constant de milieu appauvri en nutriments. Les micro-billes dans lesquelles se sont formées des micro-colonies sont ensuite détectées et isolées grâce à la cytométrie de flux. Cette approche permet le libre échange des substrats et métabolites entre les microorganismes d'une même communauté. Cette méthode a permis de réaliser des cultures à haut débit, et d'obtenir des microorganismes très diversifiés (Zengler *et al.* 2002).

➤ Des techniques récentes ont été développées afin d'isoler des cellules individuelles.

- Les pinces optiques : un laser infra-rouge associé à un microscope inversé piloté par ordinateur permet l'isolement d'une cellule individuelle d'un mélange. La cellule isolée peut être transférée dans un milieu de culture (Frohlich & König 2000, Huber *et al.* 2000a, Huber *et al.* 2000c).

- Les micromanipulateurs : le système comporte un microscope inversé et des capillaires stériles, au diamètre variable, permettant le prélèvement de cellules isolées, préalablement remises en suspension dans une solution stérile (Frohlich & König 2000).

A l'avenir, la mise au point de milieux de culture originaux et le développement de systèmes de culture innovant devraient permettre de cultiver un grand nombre de microorganismes incultivés à ce jour. L'utilisation d'extraits cellulaires dans les milieux de culture ou la réalisation de cultures d'enrichissement dans des réacteurs simulant les conditions *in situ* pourrait favoriser la croissance de microorganismes impliqués dans des relations synergiques, ce type de relations occupant très probablement une place importante dans l'environnement naturel.

5.3 L'approche "non culturelle"

La microbiologie, fondée sur l'observation et la culture des microorganismes, se base sur des techniques classiques (comptages, microscopie, marquage radioactif) auxquelles se sont ajoutées des techniques de biologie moléculaire (clonage, empreintes moléculaires, hybridation). Plus récemment encore, le séquençage de génomes complets ouvre de nouvelles perspectives dans les domaines de la génomique et de la protéomique.

Les techniques dites "classiques" de microbiologie concernent :

- le dénombrement cellulaire : utilisation de cellules de comptage vues en microscopie après marquage éventuel des microorganismes par des fluorophores (ex : DAPI, acridine orange, SYBR™ Green) ; la cytométrie en flux qui permet non seulement de compter mais aussi de trier des cellules suspension si elles sont marquées spécifiquement ; des techniques culturales basées sur la recherche de la dilution maximale pour laquelle une croissance microbienne a lieu (NPP : Nombre le Plus Probable, UFC : Unités Formant Colonie), la mesure de biomarqueurs spécifiques (ex : pigments, composants des parois et des membranes cellulaires) ;

- les mesures d'activité microbienne : l'incorporation d'isotopes radioactifs ou plus récemment d'isotopes stables permet par exemple de suivre le devenir de substrats marqués caractéristiques d'une voie métabolique (ex : $^{13}\text{CO}_2$, $^{13}\text{CH}_4$, $^{35}\text{SO}_4^{2-}$, ^{13}C -glucose) ; la mesure des ratios isotopiques permet notamment d'étudier le mode d'assimilation de composés spécifiques (ex : fixation du carbone). (Pour revue détaillée, voir Corre (2000)).

5.3.1 L'ARN ribosomique

Le principe de base consiste à comparer des gènes homologues c'est-à-dire descendant d'un ancêtre commun et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. Le choix des séquences à comparer nécessite de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes, et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet, pour comparer des organismes très éloignés il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert l'étude de séquences où des mutations se seront accumulées sur des périodes plus brèves. Même s'il n'existe pas de molécule idéale utilisable en tant que marqueur de l'évolution entre organismes, certaines caractéristiques sont requises. C'est dans les années 1970 que Carl Woese a le premier établi un arbre phylogénétique du vivant basé sur la comparaison de séquences d'ARN ribosomiques (ARNr). Le choix de cette molécule en tant qu'horloge moléculaire repose sur le fait que :

- ils sont présents dans toutes les cellules et que leur fonction est constante au cours de l'évolution,
- les séquences primaires fournissent un nombre de caractères suffisamment important pour dresser des phylogénies robustes, et sont composées de positions variables et de positions conservées.

Les ARNr s'associent à des protéines pour former les ribosomes. Au sein des microorganismes, la sous-unité 30S d'un ribosome contient de l'ARNr 16S et la sous-unité 50S contient de l'ARNr 5S et de l'ARNr 23S. L'ARNr 5S est formé d'environ 120 nucléotides, l'ARNr 16S de 1 500 nucléotides (Figure 15) et l'ARNr 23S comprend environ 2 900 nucléotides. Tous les ARNr sont monocaténares sauf dans quelques régions où se forment des boucles par appariement de bases complémentaires situées sur la même chaîne. Les gènes qui codent pour les ARNr sont organisés en opérons comportant chacun trois gènes codant pour les ARNr 16S (gène *rrs*), les ARNr 23S (gène *rrl*) et pour les ARNr 5S (gène *rrf*). Ces opérons existent en un ou plusieurs exemplaires sur le chromosome.

La molécule d'ARNr 16S comporte des régions universellement conservées permettant l'étude des relations d'organismes phylogénétiquement éloignés. D'autres régions semi-conservées sont utilisées pour l'analyse des relations entre phyla et familles, alors que les régions variables et hyper-variables de l'ARNr 16S sont discriminantes pour des organismes d'un même genre (Amann *et al.* 1995). La longueur du gène codant pour l'ARNr 16S convient pour l'amplification par PCR et le séquençage. De plus les extrémités sont hautement conservées au sein des domaines *Archaea* et *Bacteria* ce qui permet l'amplification du gène dans sa quasi-totalité par PCR. Cette dernière caractéristique

constitue le fondement de l'approche moléculaire, indépendante de l'approche culturale. Les sous-unités de l'ATPase, les facteurs d'élongation, les ARN polymérases et le facteur σ du *rpoB* ont été testés comme alternative aux gènes ribosomiaux. L'information phylogénétique déduite de l'étude de ces gènes confirme généralement celle obtenue de l'analyse des gènes de l'ARNr 16S (Rossello Mora & Amann 2001).

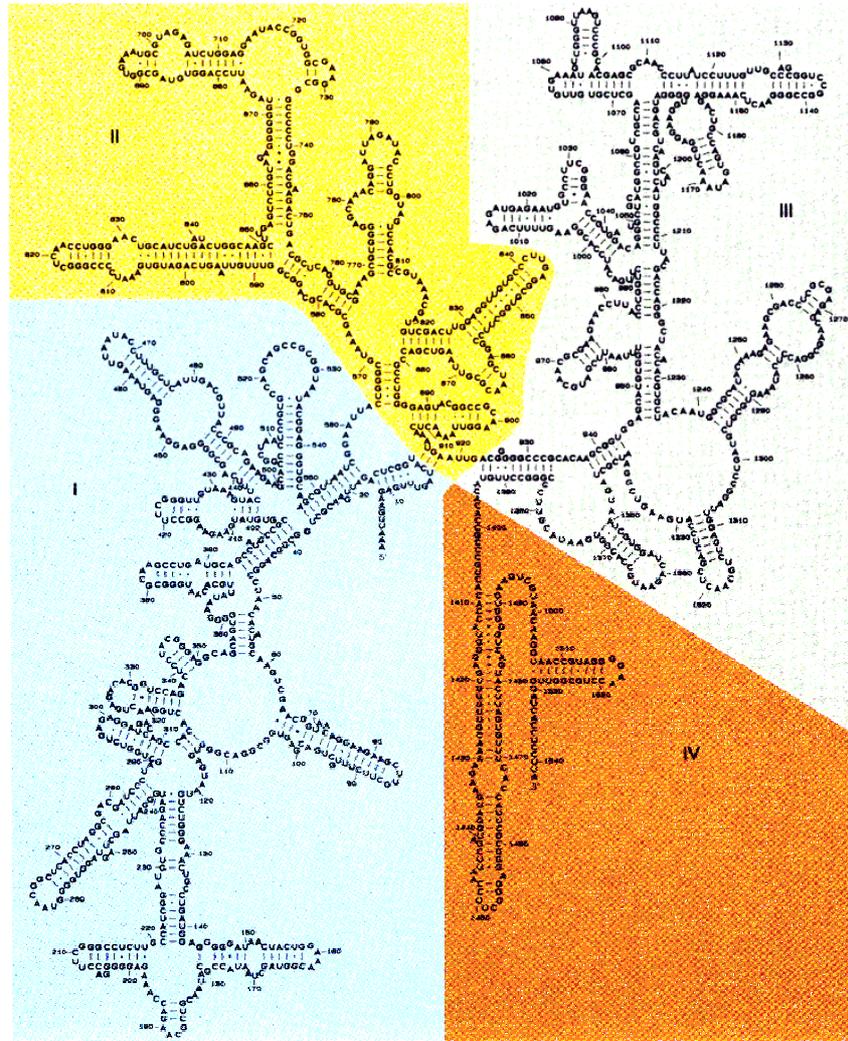


Figure 15 : Structure secondaire de l'ARNr 16S d'*E. coli*. (www.aw-bc.com/mathews/ch27/fi27p15.gif).

5.3.2 Méthodologies

La caractérisation d'un organisme en terme de phylotype ne nécessite qu'une séquence génétique et non une cellule fonctionnelle. Par conséquent, les gènes ou fragments de gènes codant pour l'ARNr 16S peuvent être sélectivement amplifiés par PCR à partir de mélanges complexes d'ADN obtenus directement d'échantillons environnementaux. Cette méthode permet alors de s'affranchir de l'étape de culture des microorganismes dans un but d'identification de ces derniers.

Un panel de séquences oligonucléotidiques, universelles pour toutes les *Bacteria* ou les *Archaea*, ou ciblant des niveaux taxonomiques spécifiques (phylum, famille, genre), est utilisé pour amplifier spécifiquement les gènes. La méthode de clonage permet d'isoler individuellement les gènes amplifiés et de les séquencer facilement. Puis les analyses phylogénétiques sont basées sur la comparaison des séquences avec celles disponibles dans des banques de données internationales. L'arbre phylogénétique finalement créé représente les relations phylogénétiques entre les séquences nouvellement obtenues et des séquences de référence. En théorie, les banques de clones représenteraient l'ensemble des molécules amplifiées par PCR, et fourniraient par conséquent une image instantanée de la diversité microbienne de l'échantillon environnemental. Cette technologie est *a priori* applicable à n'importe quel environnement et peut permettre la détection de microorganismes inaccessibles en culture.

L'analyse des banques de clones pour accéder à la diversité microbienne d'échantillons environnementaux a longtemps été freinée par la fastidieuse étape du séquençage. Différentes méthodes de criblage ont été utilisées pour explorer la diversité moléculaire des banques constituées d'un grand nombre de clones.

L'**ARDRA** (amplified rDNA restriction analysis) est une méthode de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) appliquée aux gènes ribosomiaux. Les produits d'amplification des fragments d'ADNr clonés sont incubés en présence d'une ou plusieurs enzymes de restriction. L'ensemble des fragments obtenus fournissent pour chaque ADNr cloné des profils électrophorétiques qui sont comparés entre eux. La diversité des profils obtenus reflète grossièrement la diversité de la communauté microbienne étudiée. L'utilisation de l'ARDRA peut permettre de réduire le nombre de clones à séquencer. Néanmoins, cette méthode peut être laborieuse si on considère un grand nombre de clones, et une lecture précise des gels électrophorétique s'avère souvent difficile. Cette méthode appliquée au criblage de banques de clones présente moins d'intérêt depuis le développement récent des techniques de séquençage à haut débit.

La **T-RFLP** (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) est une variante de la méthode précédente. Une amorce marquée en 5' par un fluorochrome est utilisée dans

l'étape d'amplification par PCR des ADN ribosomiaux. Les produits amplifiés sont digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction ce qui génère un ensemble de fragments de taille variable selon la séquence de l'ADN et la spécificité des enzymes de restriction. Seuls les fragments de restriction terminaux marqués par un fluorochrome sont visualisés et mesurés grâce à un séquenceur automatique.

Indépendamment du clonage, un ensemble de méthodes permet aisément de comparer la diversité microbienne de plusieurs communautés microbiennes complexes, ou l'évolution de la diversité d'une même communauté au cours du temps. Ces méthodes fournissent un "profil" ou une "empreinte génétique" de la diversité microbienne par séparation physique des acides nucléiques sur gel d'électrophorèse. Ces techniques reposent sur les différences de migration de séquences nucléotidiques, non pas en fonction de leur taille, comme dans le cas d'électrophorèses classiques, mais en fonction de leur composition en nucléotides.

La technique de **DGGE** (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a été développée au début des années 1990 (Muyzer *et al.* 1993). Cette technique est basée sur la séparation d'un mélange d'ADN double-brin de même taille (ex : ADNr 16S amplifiés par PCR), dans un gel de polyacrylamide par action simultanée de la chaleur et d'un gradient linéaire de dénaturant (urée, formamide). La mobilité des fragments dans le gel est liée à leur température de fusion T_m (T_m = "temperature melting"), c'est-à-dire la température à laquelle le duplex d'ADN est dénaturé à 50%. Le T_m est conditionné par :

- le nombre de liaisons hydrogène entre les bases complémentaires. Une liaison GC comporte 3 liaisons hydrogène qui sont détruites à une température supérieure à celle d'une liaison AT contenant 2 liaisons hydrogène,
- l'attraction entre bases voisines sur un même brin d'ADN.

La mobilité d'un fragment d'ADN dans un gel dénaturant va décroître lorsque les zones nucléotidiques à faible T_m se dissocient. Complètement dénaturé et sous forme simple brin, la migration du fragment est quasi stoppée. Ainsi, la migration de fragments présentant des séquences différentes s'arrêtera à des positions distinctes dans un gel dénaturant. Les fragments d'ADNr 16S sont couplés à une séquence de 40 pb riche en guanine et cytosine apportée par l'une des amorces au cours de la PCR et appelée "GC clamp". Ce clamp, en raison de sa très haute température de fusion, joue un rôle d'ancrage et de stabilisation des fragments dans le gel pour favoriser une meilleure séparation des fragments. Théoriquement, la technique de DGGE permet de séparer des fragments qui diffèrent d'une seule base nucléotidique. Chaque bande, ayant une mobilité propre, peut correspondre à une espèce ou à un groupe d'espèces taxonomiquement proches ou non. Les bandes peuvent ensuite être excisées du gel. Une réamplification des fragments par

PCR suivie d'un séquençage permet d'identifier et de positionner phylogénétiquement les séquences obtenues.

La **TGGE** (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) consiste à séparer par électrophorèse des fragments en appliquant un gradient de température fixe et constant tout au long de la migration (plutôt qu'un gradient de dénaturant chimique dans le cas de la DGGE) (Muyzer 1999, Muyzer & Smalla 1998).

La **TTGE** (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) est une variante impliquant une dénaturation des fragments, non pas grâce à un gradient spatial de dénaturants chimiques, mais grâce à une augmentation temporelle et linéaire de la température au cours de la migration (Muyzer & Smalla 1998).

Ces méthodes impliquent une séparation directe et physique des brins d'ADN. Elles permettent de traiter plusieurs échantillons simultanément, et d'accéder de manière rapide à des informations phylogénétiques par rapport à la méthode de clonage, beaucoup plus longue et fastidieuse. La DGGE et la TTGE sont actuellement des méthodes de choix en microbiologie environnementale, particulièrement adaptées pour le suivi de la dynamique de populations microbiennes. Elles ont été utilisées pour étudier la diversité génétique de communautés microbiennes environnementales telles que les biofilms (Muyzer *et al.* 1993), les sols (Kowalchuk *et al.* 1998), le milieu océanique profond (Teske *et al.* 1996), les sources chaudes terrestres (Ferris *et al.* 1996), des peintures murales biodégradées (Pinar *et al.* 2001), des produits alimentaires fermentés (Ampe *et al.* 1999). Deux revues complètes concernant la DGGE et la TGGE ont été publiées (Muyzer *et al.* 1997, Muyzer & Smalla 1998).

La **SSCP** (Single Strand Conformation Polymorphism) est une autre technique appropriée pour effectuer des suivis de populations. Elle peut être employée en écologie microbienne pour analyser le polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simple brin, notamment l'ADNr 16S. Après amplification par PCR d'une région variable du gène, une étape de dénaturation permet d'obtenir des ADN simple brins qui sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. Les ADN simple brins sont le siège d'interactions intra-moléculaires qui influencent, avec la masse moléculaire, la mobilité électrophorétique. Ainsi, la diversité microbienne d'un échantillon est représentée par un ensemble de bandes, détectées comme un profil de pics ou chaque pic correspond à une séquence distincte. L'aire de chaque pic donne une information relative (après PCR) sur l'abondance du microorganisme correspondant dans l'échantillon. La migration de fragments préalablement clonés et séquencés permet d'identifier les bandes d'un profil complexe. Cette technique a notamment été utilisée pour l'analyse de la diversité microbienne au sein de digesteurs anaérobie ou d'échantillons de sol (Leclerc *et al.* 2001, Stach *et al.* 2001).

L'amplification des gènes par PCR a fait l'objet d'améliorations et de développements récents notamment dans le but de rendre la PCR quantitative. La réaction de PCR classique consiste à amplifier de façon exponentielle un gène cible. Le nombre de copies du gène est théoriquement doublé à chaque cycle. En pratique, le rendement des cycles n'est pas constant et le nombre de copies en fin de réaction n'est pas proportionnel au nombre de gènes dans le mélange initial. Ces dernières années, une nouvelle technique de **PCR quantitative en temps réel** est apparue. Grâce à une chimie appropriée, les produits de PCR sont détectés en cours de réaction par fluorescence. La courbe standard représentant le logarithme de la fluorescence en fonction du nombre de cycles permet de calculer le nombre de copies. Toutes les opérations sont automatisées (ex : LightCycler®). Toutefois, cette méthode nécessite un témoin permettant une calibration. Pour rapporter le nombre de copies à un nombre de cellules, il est aussi nécessaire de connaître le nombre de copies du gène généralement contenues dans le génome des microorganismes recherchés. Cette méthode permet d'accéder au nombre de cellules dans un échantillon environnemental, mais nécessite une connaissance du microorganisme recherché (amorces spécifiques, nombre de copies du gène dans le génome). Cette méthode est rapide (\approx 2h) et directe : il n'y pas d'étape d'électrophorèse pour analyser les produits d'amplification. Cette méthode peut être très spécifique en fonction des amorces choisies. Plusieurs séquences cibles peuvent être détectées simultanément (PCR multiplex).

L'analyse de la structure d'une communauté peut s'effectuer par des **techniques d'hybridation**. A la différence des techniques d'analyse par extraction et séquençage de l'ADNr 16S, l'utilisation de sondes nucléiques permet d'accéder individuellement aux cellules. Grâce aux domaines conservés, variables et hypervariables de l'ARNr 16S, des sondes aux spectres de spécificité plus ou moins large (du domaine à l'espèce) peuvent être conçues. Les sondes, de 20 à plus de 50 nucléotides, sont marquées en 5' par des enzymes ou des fluorochromes. Elles peuvent être utilisées sur de l'ADN fixé sur membrane (Dot Blot), sur des colonies cellulaires, sur des cultures d'enrichissement ou des souches pures (Whole-cell hybridization), ou directement sur échantillon environnemental (hybridation *in situ*, ou FISH si les sondes sont marquées par un fluorochrome (Amann *et al.* 1990)). Le FISH constitue un outil majeur dans l'analyse des structures des communautés microbiennes dans l'environnement.

L'accessibilité des sondes à la molécule cible est un facteur essentiel à la qualité de l'hybridation. L'utilisation des sondes dépend de leur T_m et de leur contenu en bases G et C. Une première phase de l'hybridation sur cellules consiste à perméabiliser les cellules et fixer les acides nucléiques à l'aide de (para-)formaldéhyde le plus souvent. L'étape d'hybridation des cellules au moyen de sondes marquées se fait dans des conditions de stringence

particulières, définies par la température d'hybridation et la concentration en formamide. Après lavage, les cellules sont observées sous microscope à épifluorescence. Plusieurs sondes aux spécificités différentes peuvent être employées simultanément pour l'étape d'hybridation. L'hybridation sur cellule entière fournit une information morphologique et permet de compter les cellules cibles dans un échantillon.

Récemment, différentes variantes du FISH ont été développées afin d'en accroître la sensibilité dont la technique CARD-FISH (pour Catalyzed Reporter Deposition coupled with Fluorescence In Situ Hybridization) qui repose sur l'amplification du signal de la tyramide (TSA amplification) catalysée par la peroxydase du raifort (HRP pour Horseradish peroxydase) (Pernthaler *et al.* 2002). La détection simultanée d'ARN ribosomaux et messagers par la méthode du FISH permet d'identifier des cellules et de montrer l'expression d'un gène particulier (Pernthaler & Amann 2004). La technique de FISH-microautoradiographie permet à la fois d'identifier des cellules individuelles par leurs ARN ribosomaux et de détecter une incorporation éventuelle de substrats marqués par ces cellules au sein de communautés microbiennes complexes (Lee *et al.* 1999). Un article récent décrit le couplage de microautoradiographie et de CARD-FISH (Teira *et al.* 2004).

Le développement des technologies de séquençage à haut-débit donne lieu à des perspectives sans précédent dans le domaine de la microbiologie. 220 génomes complets de microorganismes sont à ce jour disponibles en banque (199 génome bactériens et 21 génomes archéens (<http://www.genomesonline.org/>). L'analyse de ces génomes permet d'identifier *in silico* les gènes présents dans un microorganisme donné. Ces gènes peuvent être impliqués dans des voies métaboliques nouvelles, la régulation de l'expression des gènes, la pathogénicité, la résistance aux antibiotiques. Cependant un grand nombre de gènes ont des fonctions encore inconnues. L'analyse du génome complet de l'archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* a fourni une carte quasi-complète de ses voies métaboliques, et la détection de plusieurs gènes candidats a confirmé l'existence potentielle d'une variante de la voie d'Embden-Meyerhof (Cohen *et al.* 2003). L'étude des génomes complets fournit aussi des perspectives nouvelles dans l'évolution des gènes et des espèces.

L'ensemble des génomes d'une communauté microbienne peut aussi être considéré comme une seule et même grande communauté de génomes, appelée métagénome (Rondon *et al.* 2000). La métagénomique s'avère être une discipline prometteuse pour élucider le fonctionnement d'écosystèmes microbiens complexes en s'affranchissant de toute étape de culture. A partir d'ADN extrait d'échantillons environnementaux, de grands fragments (35 à 200 kb) sont clonés dans des vecteurs tels que les cosmides, les fosmidés ou les BACs. Les fragments clonés sont séquencés, soit en aveugle (méthode du "Shotgun")

ou par marche sur le chromosome (méthode du "chromosome-walking"). Les séquences sont ensuite comparées à celles disponibles en banque de données. Cet accès direct à des portions de génomes peut renseigner simultanément sur la phylogénie et potentiellement sur le phénotype par la détection d'un ADNr 16S et de gènes de fonction sur un même segment génomique. L'application la plus impressionnante de cette méthodologie est probablement l'étude de populations microbiennes de la mer des Sargasses, réalisée par Venter et son groupe grâce, entre autres, à de très puissantes capacités de séquençage (Venter *et al.* 2004). Un total de $1\,045 \cdot 10^{12}$ paires de bases a été généré, annoté et analysé. Les données seraient issues de 1800 espèces génomiques, incluant 142 nouveaux phylotypes microbiens. Mais cette stratégie n'est pas dépourvue de biais et divise la communauté scientifique (Rodriguez-Valera 2004). Le choix d'une communauté microbienne appropriée est une priorité pour ce genre d'étude.

Génomique et métagénomique fournissent des outils pour l'étude de la structure et de la fonction de populations microbiennes complexes. Cependant, ces avancées nécessitent le développement d'outils de bioinformatique qui devraient faciliter la gestion des banques de données (génomomes complets ou segments de génomes), et favoriser l'interaction entre les banques.

L'émergence de la protéomique, l'analyse à grande échelle des protéines, est due à la prise de conscience que le produit final d'un gène est fondamentalement plus complexe et plus informatif d'une fonction que le gène lui-même. La difficulté à prédire à la fois l'existence et la fonction de gènes par bioinformatique a aussi montré la nécessité d'analyser les protéines. En outre, seule l'étude des protéines permettra de déterminer les modifications post-traductionnelles, celles-ci pouvant affecter considérablement la fonction d'une protéine. La protéomique est une discipline qui progresse grâce à l'accumulation des banques de données relatives aux acides nucléiques et aux protéines, grâce au développement de la spectrométrie de masse, et au développement d'algorithmes pour effectuer des recherches dans les banques de données. Actuellement, la protéomique est surtout fonctionnelle : il s'agit d'identifier et caractériser des protéines-cibles, plutôt que le protéome entier, pour répondre à une question spécifique de biologie (Graves & Haystead 2002). L'étude du protéome d'un microorganisme devrait permettre d'élucider son fonctionnement et sa stratégie de réponse à des changements de conditions environnementales.

5.3.3 Les biais des méthodes d'analyse des séquences ribosomales

Les techniques moléculaires, indépendantes de l'approche culturale, ont leurs propres biais, introduits à chaque étape. Une vision déformée du "monde réel" peut en découler. Mais être conscient de ces biais peut suffire à les minimiser.

Prélèvement et traitement de l'échantillon environnemental

L'échantillonnage et l'extraction d'ADN font certainement partie des étapes les plus cruciales dans l'analyse de la diversité microbienne. L'échantillon devrait être représentatif de l'écosystème étudié et les techniques de prélèvement des échantillons dans des environnements difficiles (par ex. marins et/ ou extrêmes) pourraient être améliorées. Les contaminations par l'eau, le sol, la boue, l'air environnant ou au laboratoire devraient être limitées par une attention particulière au cours des transports, du stockage et du traitement (Amann *et al.* 1995). La lyse des cellules constitue un autre point critique dans une approche basée sur la PCR. Une lyse disproportionnée ou insuffisante des cellules de l'échantillon environnemental va probablement biaiser la vision de la composition en microorganismes de l'échantillon initial, car certains acides nucléiques n'auront pas été libérés des cellules et échapperont à l'analyse finale. Les bactéries à Gram-positif sont plus difficiles à lyser que des bactéries à Gram-négatif, d'où l'utilisation de lysozyme pour éviter un biais dans l'extraction à ce niveau. Des traitements physiques et chimiques trop poussés dans l'étape de lyse cellulaire peuvent considérablement fragmenter l'ADN extrait ce qui favorise la production de chimères lors de la réaction d'amplification par PCR (Wintzingerode *et al.* 1997).

Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Plusieurs biais sont connus pour être introduits lors de l'étape d'amplification par PCR. La co-extraction de contaminants en même temps que l'ADN total peut inhiber la réaction de PCR ; des produits de PCR chimères peuvent être formés artéfactuellement. Les acides humiques et les polysaccharides co-extraits sont de forts inhibiteurs des ADN polymérase. Leurs concentrations peuvent être abaissées par l'utilisation de molécules telles que le CTAB (cetyl-triméthylammonium bromide) ou le PVPP (polyvinyl-pyrrolidone) lors du processus d'extraction de l'ADN (Holben *et al.* 1988). L'addition de BSA (bovine serum albumin) dans le mélange réactionnel de la PCR peut contrecarrer l'effet inhibiteur de contaminants. Par ailleurs, la fidélité de l'amplification par PCR varie selon l'ADN polymérase choisie. Les ADN polymérase ayant une capacité de "relecture" et de "correction" (proof reading), l'activité 3'-5' exonucléase, limitent les erreurs d'incorporation au cours de l'amplification et favorise des produits d'amplification aux séquences fidèles.

L'ADN amplifié ne peut refléter l'abondance relative des microorganismes dans un échantillon que si l'efficacité de l'amplification est la même pour toutes les molécules. Ceci est rarement le cas car les échantillons d'ADN environnementaux constituent des mélanges hétérogènes : le nombre de copies de gène et la concentration en ADN varient selon les microorganismes. Ainsi, lors de l'étape d'hybridation des amorces, les hybrides amorce-matrice ne se forment pas tous avec la même efficacité selon la quantité d'ADN-matrice disponible. De plus l'efficacité de l'ADN polymérase n'est pas la même pour tous les ADN-

matrice. L'utilisation d'amorces universelles dégénérées, plutôt que spécifique à un taxon, et le nombre de cycles de réplication ont une influence majeure sur l'image finale de la diversité des séquences amplifiées (Wintzingerode *et al.* 1997). L'ADN matrice originaire de l'échantillon initial est principalement amplifié pendant les 5-6 premiers cycles de la réaction de PCR, et l'amplification des fragments produits dans cette première phase a lieu au cours des cycles suivants. Les séquences les plus représentées et possédant une bonne affinité pour les amorces seront donc amplifiées préférentiellement (Dahllof & Kjelleberg 2002). Par conséquent, les microorganismes rares dans l'écosystème seront difficilement détectés.

Les banques de clones

Dans l'analyse d'un écosystème microbien, la PCR génère un mélange hétérogène de séquences, qui doivent être séparées avant séquençage. Le clonage de ces séquences est une méthode très employée. Les méthodes de criblage telles que l'ARDRA sont de moins en moins utilisées depuis l'essor des techniques de séquençage à haut débit. L'analyse d'un nombre de clones restreint permet alors d'identifier les membres dominants de la communauté étudiée. Le sol ou les sédiments sont par contre des biotopes dont la diversité microbienne peut dépasser les 1000 espèces et nécessiteraient l'analyse d'au moins autant de clones pour détecter toutes les espèces présentes. Par ailleurs, une étude récente a démontré que le nombre de copies des opérons *rnm* et l'hétérogénéité des séquences au sein d'un même organisme biaisait quantitativement les inventaires moléculaires vers les organismes présentant le plus grand nombre de copies (Crosby & Criddle 2003).

5.4 L'approche pluridisciplinaire et image actuelle de la diversité microbienne

Les méthodes permettant d'analyser la diversité microbienne fournissent chacune un certain type d'informations et comportent des avantages et des inconvénients. Par exemple, la DGGE permet de suivre l'évolution d'une communauté, ou de comparer des communautés entre elles, mais les fragments d'ADN utilisés sont relativement courts et l'information phylogénétique correspondante est limitée. Par contre le clonage et le séquençage de gènes complets donne plus de précision sur la position phylogénétique des microorganismes détectés. Ces méthodes fournissent peu d'indices quant à la distribution spatiale et temporelle des cellules. La méthode du FISH utilisant des sondes oligonucléotidiques *in situ* révèle l'abondance relative des microorganismes ciblés mais n'apporte pas d'informations phylogénétiques précises relatives aux cellules détectées. De plus, l'obtention de souches pures en culture malgré les nouvelles méthodes de culture ne permet à ce jour de cultiver qu'une fraction des microorganismes de l'environnement. On remarque également que les microorganismes issus d'environnements naturels et cultivés *in*

in vitro par des méthodes traditionnelles sont rarement ceux qui dominent *in situ* d'un point de vue quantitatif ou fonctionnel.

C'est principalement en adoptant une approche pluridisciplinaire que l'on accèdera à des informations significatives sur la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes (Figure 16).

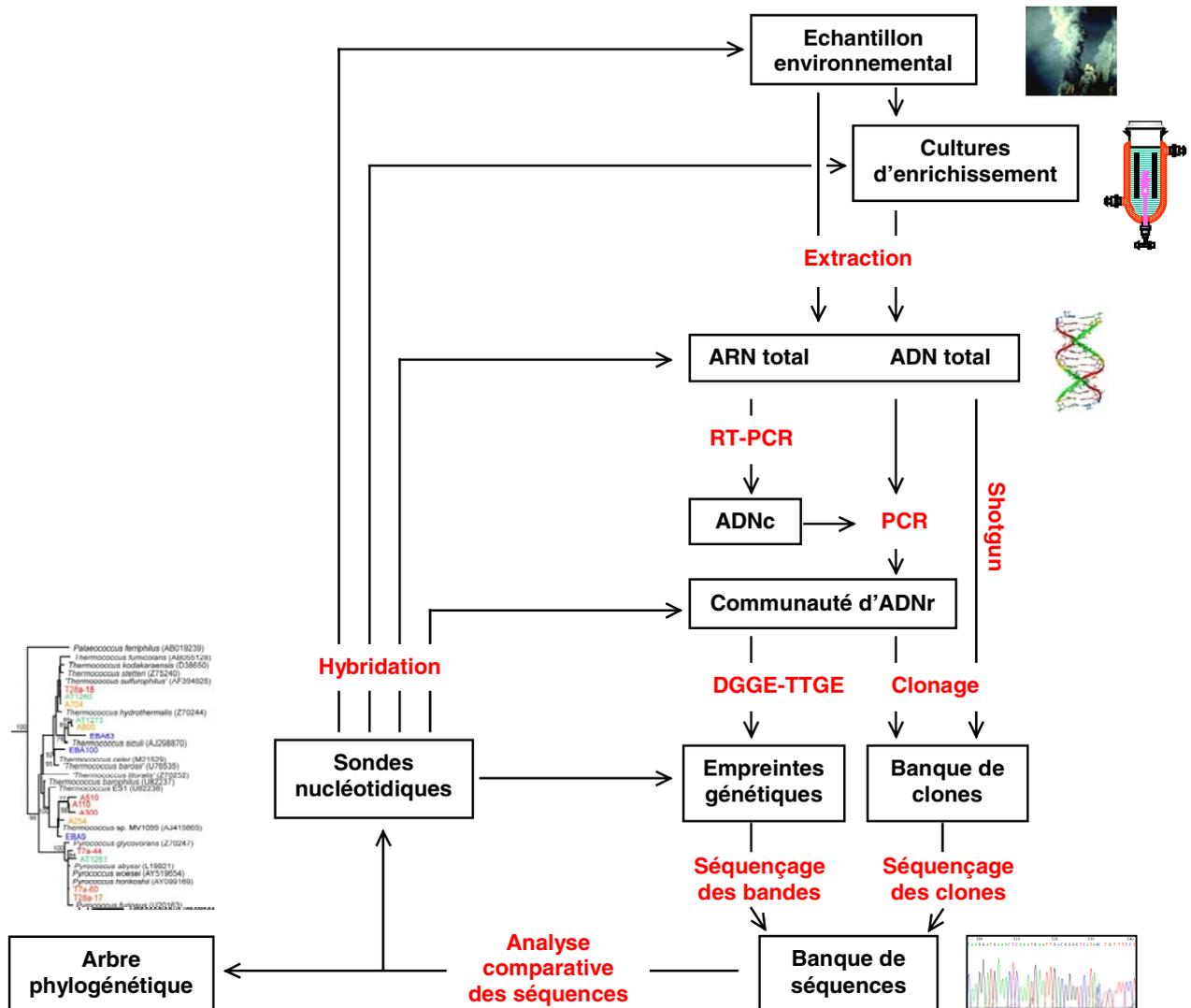


Figure 16 : Schéma global des techniques moléculaires pour l'étude de la structure et de la dynamique des communautés microbiennes.

Le but des techniques basées sur la PCR est d'obtenir des informations de séquences qui permettent d'estimer la diversité microbienne des microorganismes à la fois cultivés et incultivés par analyse comparative des séquences d'ADNr 16S. Le développement de ces méthodes a engendré une quantité d'informations énormes concernant une variété d'écosystèmes. La figure 17 présente une image de la diversité bactérienne et archéenne telle qu'elle est connue à ce jour. Les branches de cet arbre correspondent à des groupes de microorganismes cultivés (22 pour les *Bacteria*, 8 pour les *Archaea*), et des groupes ne contenant aucun membre cultivé à ce jour (13 chez les *Bacteria*, 10 chez les *Archaea*).

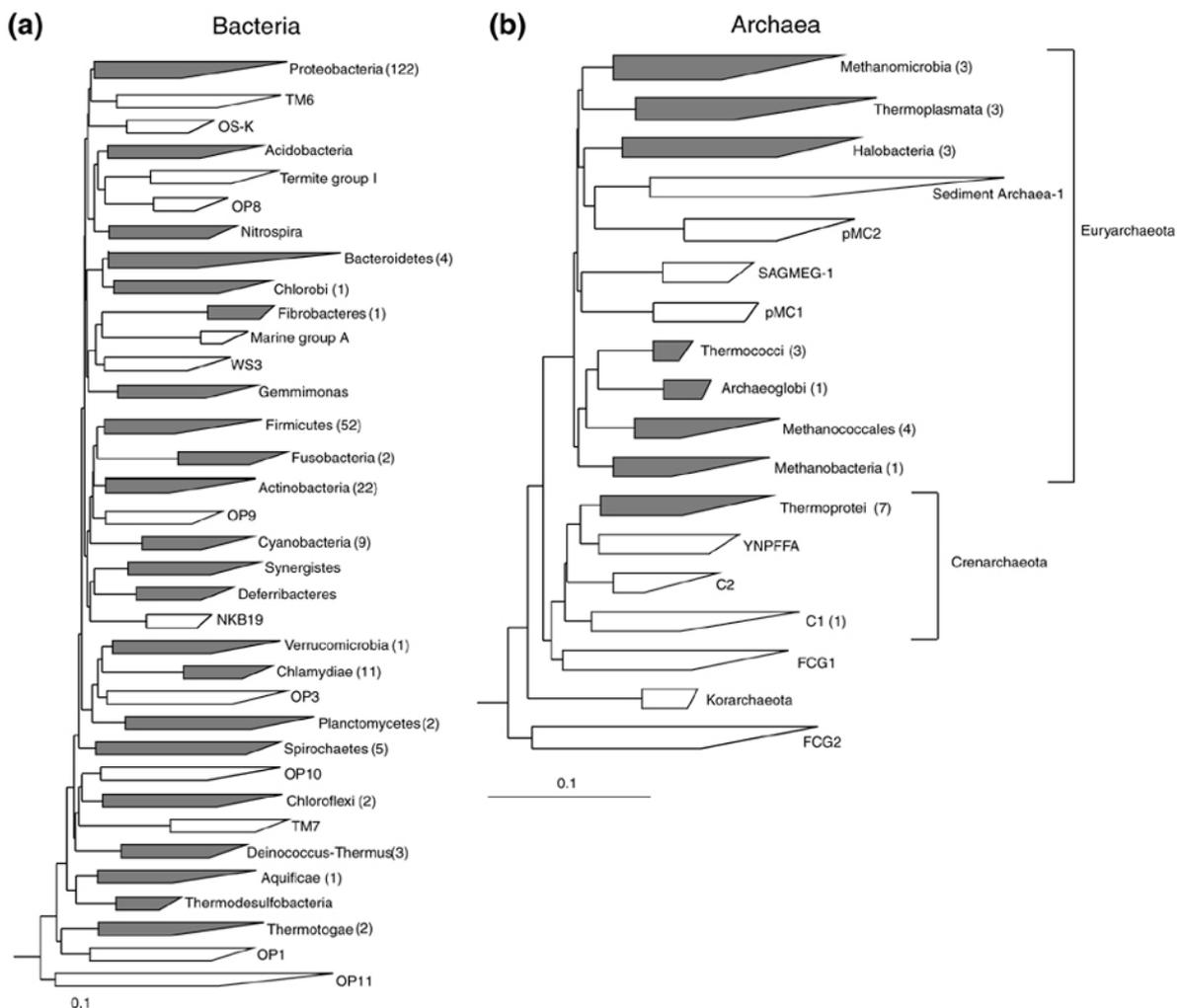


Figure 17 : Position phylogénétique des différents phyla bactériens (a) et archéens (b) d'après l'analyse de séquences d'ADNr 16S (méthode Neighbor-Joining). Les phyla possédant des représentants cultivés sont en noir, et les phyla ne possédant que des séquences environnementales sont en blanc. Barre d'échelle : 0,1 changement par nucléotide (Hugenholtz 2002).

6 Présentation de l'étude

La diversité microbienne des écosystèmes hydrothermaux océaniques a d'abord été étudiée par approche culturale, et plus récemment par approche moléculaire. L'engouement initial pour le compartiment hyperthermophile hétérotrophe, puis l'intérêt croissant pour d'autres groupes métaboliques notamment autotrophes (méthanogènes, sulfatoréducteurs etc.) ont conduit à l'isolement d'une centaine d'espèces, *Archaea* et *Bacteria*, impliquées dans la plupart des cycles biogéochimiques étant donné la gamme des donneurs et accepteurs d'électrons disponibles *in situ*. L'essor des techniques moléculaires, principalement basées sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S, a permis la mise en évidence d'une grande diversité phylogénétique dans l'écosystème. Toutefois, cette image de la diversité ne reflète pas la diversité des phénotypes. En effet, ces séquences ne permettent pas toujours d'inférer un fonctionnement métabolique et donc un rôle écologique aux microorganismes détectés en particulier lorsqu'ils appartiennent à des lignées qui ne sont représentées par aucun membre cultivé. L'approche moléculaire a permis la mise en évidence d'une importante diversité, mais seuls 1 à 10% des microorganismes détectés seraient cultivés à ce jour (Amann *et al.* 1995). D'autre part, les techniques de culture classiques, impliquant une sélection des microorganismes cultivés, fournissent une image restreinte de la diversité microbienne d'un écosystème. Cependant, certaines études décrivent l'isolement de microorganismes nouveaux à partir d'échantillons environnementaux dont l'inventaire moléculaire n'en avait pas permis la détection (Alain *et al.* 2004, Gonzalez-Toril *et al.* 2003). Il apparaît alors clairement qu'aucune des deux approches, culturale ou moléculaire, ne permettra seule d'élucider les questions d'écologie microbienne, concernant par exemple la biodiversité, le fonctionnement et la dynamique des communautés microbiennes (Leadbetter 2003).

L'utilisation de nouvelles techniques de culture permettant de mieux reproduire les conditions environnementales des habitats naturels, avec l'objectif de cultiver des populations sur de longues périodes plutôt que des souches pures, apparaît alors comme une alternative prometteuse (Palleroni 1997). Un système de fermentation gas-lift dédié à la culture des microorganismes hyperthermophiles anaérobies a été développé par N. Raven et importé au laboratoire avant mon arrivée.

Le fermenteur gas-lift a d'abord été mis au point pour la culture en l'absence de soufre d'hyperthermophiles soufre-réducteurs de l'ordre archéen des *Thermococcales*. En présence de soufre, l'hydrogène (produit du métabolisme fermentaire) est éliminé sous forme d'hydrogène sulfuré (H_2S), hautement corrosif pour les métaux et toxique pour l'expérimentateur. La culture en continu d'hyperthermophiles en présence de soufre nécessite l'utilisation de matériaux résistants à la corrosion, mais ils sont fragiles (verre) ou

très coûteux (aciers spéciaux, titane). Le fermenteur gas-lift permet de cultiver des *Thermococcales* en absence de soufre : la mise en place d'un balayage de la culture par un gaz inerte (N₂, Ar...) permet l'élimination des produits volatiles de la fermentation tel que l'hydrogène potentiellement toxique pour les microorganismes cultivés (Raven *et al.* 1992). De plus la production d'hydrogène sulfuré, gaz toxique, est également évitée. Ce système permet donc de mener des fermentations sans soufre avec des matériaux classiques.

Ce système a d'abord été optimisé pour la culture de *Pyrococcus furiosus*, archée hyperthermophile de l'ordre des *Thermococcales* et a permis :

- l'obtention de concentrations cellulaires élevées et l'utilisation de biomasse pour la purification d'enzymes natives (Raven *et al.* 1992),
- la mise au point d'un milieu minimum pour la culture de cette souche en fermenteur (Raven & Sharp 1997),
- l'étude physiologique de *Pyrococcus abyssi* (Godfroy *et al.* 2000),
- et récemment l'optimisation des conditions de croissance de *Thermococcus hydrothermalis* en fermenteur ainsi que la mise au point d'un milieu défini et minimum sans soufre (Postec *et al.* 2005, voir annexe 4).

Par ailleurs, la structure de communautés microbiennes cultivées en continu a fait l'objet d'analyses temporelles mettant en évidence une succession des populations, et ainsi l'existence d'une dynamique au sein de cultures en continu. Un digesteur anaérobie alimenté en glucose et inoculé par un échantillon de boue activée a été suivi pendant 107 jours (Leclerc *et al.* 2001). L'analyse de la population par SSCP a permis d'affilier les populations archéennes dominantes à des méthanogènes, et de mettre en évidence une dynamique au sein de cette population : un changement important de structure a été observé dans les premiers jours ainsi que l'apparition d'une nouvelle espèce dominante (*Methanobacterium formicicum*) à partir du 21^e jour et ce jusqu'à la fin de l'expérience, espèce qui n'avait pas été détectée au 1^{er} jour. Dans l'étude des process de bioremédiation, la biodégradation de l'hexadécane a été analysée *in vitro*. Une culture continue réalisée en bioréacteur a été alimentée par de l'hexadécane comme seule source de carbone, et inoculée par une suspension de sédiments marins côtiers de la mer du Nord. Après une phase initiale de batch de 48h, le taux de dilution a été augmenté de 0,008 à 0,047 h⁻¹. L'utilisation de sondes oligonucléotidiques a permis de mettre en évidence des changements importants dans la structure de la population cultivée : une grande quantité de *Cytophaga/Flavobacteria* a été détectée en début de culture, laissant place à une communauté dominée par des γ -*Proteobacteria* après augmentation du taux de dilution (Bruns & Berthe-Corti 1998).

Le fermenteur "gas-lift" a été utilisé pendant ma thèse pour réaliser des cultures d'enrichissement en continu à haute température à partir d'échantillons de cheminée hydrothermale, afin d'accéder à une fraction de la population microbienne jusque là incultivée. Dans des cultures classiques d'enrichissement en batch, les espèces les plus représentées et/ou poussant le plus vite prennent le dessus, consomment les substrats et relarguent dans le milieu des produits du métabolisme (H_2S , H_2 , acides organiques etc.) qui peuvent inhiber la croissance des autres espèces.

L'utilisation du fermenteur gas-lift permet de réaliser des cultures en conditions contrôlées : le pH, la température et le balayage gazeux sont régulés à une valeur stable. Le fermenteur permettra aussi la réalisation de cultures en continu : dans ces conditions le milieu, et donc les substrats, sont apportés en continu avec un débit contrôlé. L'évolution de la population dans le fermenteur pourra être suivie au cours du temps, grâce à l'utilisation d'outils moléculaires. L'idée de départ était surtout que la culture en continu, avec des conditions contrôlées et un balayage gazeux efficace, allait permettre la croissance des espèces les moins représentées dans l'échantillon, ou présentant de longs temps de latence et/ou temps de génération.

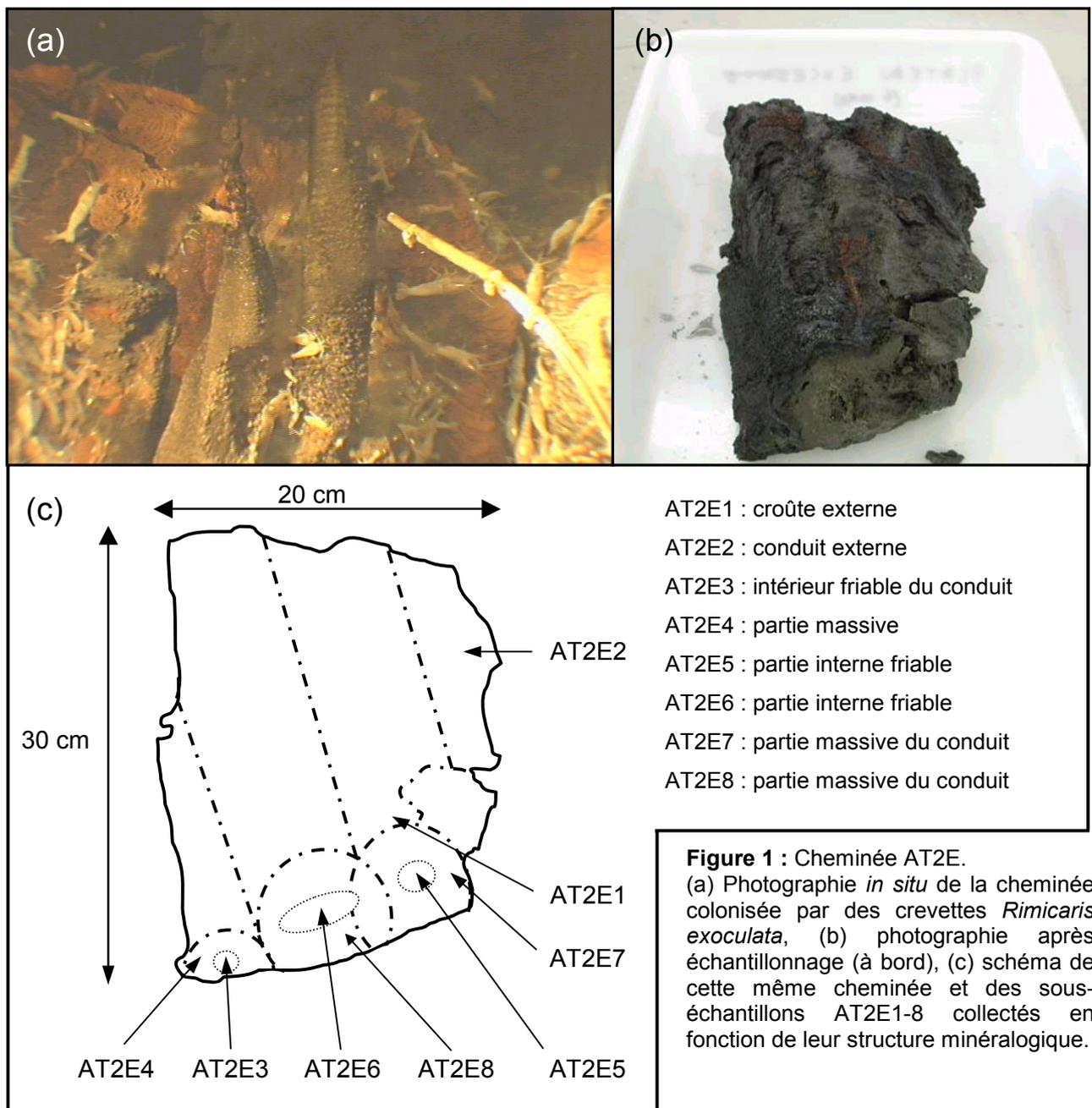
Après un chapitre "Matériel et méthodes" développant principalement les méthodes de cultures et les techniques moléculaires utilisées, les résultats sont présentés de la façon suivante :

- étude de la diversité archéenne et bactérienne d'une cheminée hydrothermale du site Rainbow, par réalisation d'inventaires moléculaires (**Chapitre 1**),
- la réalisation de cultures d'enrichissement en flacon et en bioréacteur à partir de cette cheminée, et l'analyse des populations cultivées :
 - enrichissements à 90°C (**Chapitre 2**),
 - enrichissements à 60°C (**Chapitre 3**),
- la caractérisation d'une nouvelle espèce bactérienne thermophile appartenant au genre *Marinitoga* isolée d'une culture d'enrichissement en bioréacteur (**Chapitre 4**).

Matériel et Méthodes

1 Cheminée hydrothermale et échantillonnage

Les échantillons étudiés pendant ma thèse ont été prélevés à 2275 m de profondeur en juin 2001, au cours de la campagne ATOS (chef de mission : P-M Sarradin), dans le cadre du programme européen Ventox : "Deep sea hydrothermal vents : a natural pollution laboratory (EVK3 CT1999-00003)". Cette campagne s'est déroulée sur la dorsale Médio-Atlantique. Les échantillons de cette étude proviennent du site Rainbow (36°13'N, 33°54'W) (Figure 4, Introduction bibliographique). Ce site a pour particularité d'être situé sur des roches ultramafiques caractéristiques du manteau. La faune associée était essentiellement composée de crevettes (Figure 1).



Une cheminée active (fumeur noir) a été collectée par le ROV (robot Victor ou Remote Operated Vehicle) et remontée à la surface dans une boîte étanche décontaminée. A bord, la cheminée a été sous-échantillonnée en huit fractions en fonction de leur structure minéralogique (Figure 18c). Chaque sous-échantillon a été broyé dans une enceinte anaérobie (La Calhene, France) et stocké dans des flacons sérum remplis d'eau de mer stérile et contenant 0.5 mg. L^{-1} de Na_2S .

Après agitation vigoureuse, un mélange équivolume des huit sous-échantillons noté AT2E1-8 a été réalisé afin de représenter l'ensemble de la cheminée. Cet échantillon AT2E1-8 a fait l'objet d'une analyse moléculaire basée sur l'étude du gène de l'ARNr 16S, et a servi d'inoculum à l'ensemble des cultures d'enrichissement réalisées au cours de ma thèse.

2 Techniques de culture et conditions d'enrichissement

2.1 Milieu d'enrichissement "F1"

Le milieu F1 est un milieu riche, à base d'eau de mer, contenant des sources organiques complexes (extrait de levure, casaminoacides), des sucres, des sels et minéraux ainsi que du soufre (Tableau 1). C'est un milieu peu sélectif conçu pour cultiver le plus grand nombre de micro-organismes. Ce milieu a servi pour toutes les expériences de culture d'enrichissement, en flacon (culture en batch) et en fermenteur gas-lift (culture en continu).

Tableau 1 : Composition du milieu "F1" modifié d'après le milieu SME (Raven *et al.* 1992, Sharp & Raven 1997, Stetter *et al.* 1983).

		Composants	(g ou mL). L⁻¹
Sources organiques complexes	extrait de levure (Difco)	casaminoacides	1 g
		(Difco)	0.5 g
Sucres ¹		glucose	0.4 g
		dextrine	0.4 g
		D(+)-galactose	0.2 g
		dextrane	0.2 g
		glycogène	0.1 g
		pyruvate	0.2 g
		acétate	0.1 g
Sels et minéraux		NaCl	28 g
	solution de sels de magnésium	²	10 mL
		solution A	³ 1 mL
		solution B	⁴ 1 mL
		solution C	⁵ 1 mL
		solution D	⁶ 1 mL
Vitamines	solution de vitamines	⁷	0.5 mL
Indicateur ⁸	solution de résazurine (1 mg mL^{-1})		0.5 mL
Tampon ⁹		PIPES	6,05 g
		Soufre ¹⁰	3 g ou 10 g

¹ Tous les **sucres** sont fournis par Sigma.

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

³ **Solution A** (par litre) : MnSO₄, 4 H₂O, 9 g; ZnSO₄, 7 H₂O, 2.5 g; NiCl₂, 6 H₂O, 2.5 g; AlK(SO₄)₂, 12 H₂O, 0.3 g; CoCl₂, 6 H₂O, 0.3 g et CuSO₄, 5 H₂O, 0.15 g.

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

⁵ **Solution C** (par litre) : K₂HPO₄, 50 g; H₃BO₃, 7.5 g; Na₂WO₄, 2 H₂O, 3.3 g ; Na₂MoO₄, 2 H₂O, 0.15 g; et Na₂SeO₃, 0.005 g.

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

⁷ La composition de la **solution de vitamines** a été précédemment décrite (Sharp & Raven 1997).

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

⁹ Le PIPES (acide piperazine-N, N'-bis-2-ethanesulfonique) est un tampon utilisable pour une gamme de pH de 6,1 à 7,5. Il est présent dans les milieux pour culture en flacon (en bioréacteur, le pH est régulé en continu).

¹⁰ Le soufre colloïdal a été utilisé pour les cultures en bioréacteur (pour éviter de colmater les tuyaux).

2.2 Cultures en flacon

2.2.1 Verrerie

Les cultures en milieu liquide peuvent être réalisées dans des **flacons pénicilline** de 25, 50 ou 100 mL qui sont généralement remplis respectivement avec 10, 20 et 50 mL de milieu de culture. Les flacons sont bouchés par un septum en caoutchouc (butyl) et sertis par une capsule en aluminium. Les **tubes de Hungate** d'un volume total de 20 mL contiennent généralement 6 mL de milieu et sont également bouchés par un septum. Ils sont par exemple utilisés pour réaliser des séries de dilution dans un procédé d'isolement de souche, ou pour suivre par absorbance une croissance microbienne. Les cultures en grand volume (250 mL à 2 L) sont effectuées dans des **flacons sérums**. La verrerie est stérilisée au four Pasteur, 3h à 150°C, avant utilisation pour cultures.

2.2.2 Préparation des milieux : stérilisation et répartition en anaérobiose

☞ La **stérilisation** des milieux peut s'effectuer de différentes manières :

- par autoclavage : 20 min à 121°C dans l'autoclave,
- par tyndallisation : deux périodes de 30 min à 100°C dans l'autoclave, séparées par une période de refroidissement complet. La tyndallisation est utilisée pour la stérilisation des milieux contenant du soufre qui est sensible à la température,

- par filtration : les filtres utilisés ont une porosité de 0,22 μm (Millipore). Ce mode de stérilisation préserve les éventuels composants thermolabiles du milieu (par ex. vitamines), et permet d'éviter les réactions de Maillard (réactions à chaud entre les groupements aldéhyde des sucres et les amines des peptides, "caramélisation"). Pour les milieux contenant des sucres et des peptides, les solutions concentrées de sucres peuvent être filtrées séparément avant d'être ajoutées aux milieux.

☞ Pour réaliser des cultures en **anaérobiose** (Figure 2) , les milieux de culture stérilisés sont entrés dans une enceinte anaérobie où ils sont répartis dans les flacons de culture.

L'enceinte anaérobie contient un mélange gazeux composé de $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{CO}_2$ (90/5/5). La circulation de ce mélange gazeux à travers un catalyseur au palladium assure le maintien des conditions de réduction. Le catalyseur est inefficace en atmosphère humide et doit être souvent changé, ou régénéré par passage à l'étuve 3h à 180°C. Les surfaces internes de l'enceinte sont nettoyées avec un produit antibactérien exempt d'oxygène (par ex ; Mercryl® contenant un ammonium quaternaire). Le matériel est décontaminé à l'alcool avant d'être entré dans l'enceinte. Au laboratoire, une enceinte anaérobie est consacrée à la répartition des milieux stériles, une seconde enceinte sert à la manipulation des cultures (inoculation etc.).



Figure 2 : Enceinte anaérobie

L'entrée du matériel propre dans l'enceinte se fait *via* un sas : une pompe à vide permet d'éliminer l'air, puis le sas est rempli d'azote, vidé une seconde fois, et rempli du mélange $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{CO}_2$ (90/5/5).

Dans l'enceinte, les milieux sont réduits par addition de 20 mL. L^{-1} de Na_2S à 2,5% (w/v), soit une concentration finale de 5 mg. L^{-1} .

2.2.3 Les expériences de cultures d'enrichissement réalisées en fiole pénicilline (batch)

Les cultures en flacon ont été réalisées dans des conditions analogues à celles des cultures en fermenteur gas-lift en terme d'inoculum, de milieu, de pH et de température. Ainsi, les cultures ont été réalisées en flacon pénicilline de 100 mL contenant 80 mL de milieu "F1". A la différence du milieu préparé pour la culture en bioréacteur, ces milieux contiennent 10 g. L^{-1} de soufre "fleur" ainsi que 6,05 g. L^{-1} de PIPES afin de tamponner le milieu. Les milieux ont été inoculés à hauteur de 2% avec l'échantillon de cheminée AT2E1-8. Les cultures ont été incubées en anaérobiose, à pH 6,5, à 60°C et à 90°C. Ces

cultures en flacons sont réalisées en batch (sans renouvellement de milieu), en l'absence de balayage gazeux et de contrôle des paramètres physico-chimiques, ce qui constituent les différences fondamentales avec les cultures en fermenteur gas-lift.

Les deux cultures d'enrichissement à 60°C et 90°C ont été menées en parallèle et suivies par observations au microscope Olympus BX60 à contraste de phase (X400) afin de détecter une croissance microbienne. Finalement, les cultures suivantes ont été prélevées en vue d'extractions d'ADN et d'hybridation oligonucléotidiques (voir "Prélèvement des échantillons" 2.4.1) :

- après 24 h et 41 h d'incubation pour les cultures à 60°C, et une sous-culture de 17 h réalisée à partir de la culture de 24 h ;

- après 45 h et 65 h d'incubation pour les cultures à 90°C, et une sous-culture de 20 h réalisée à partir de la culture de 45 h (voir Figure 3).

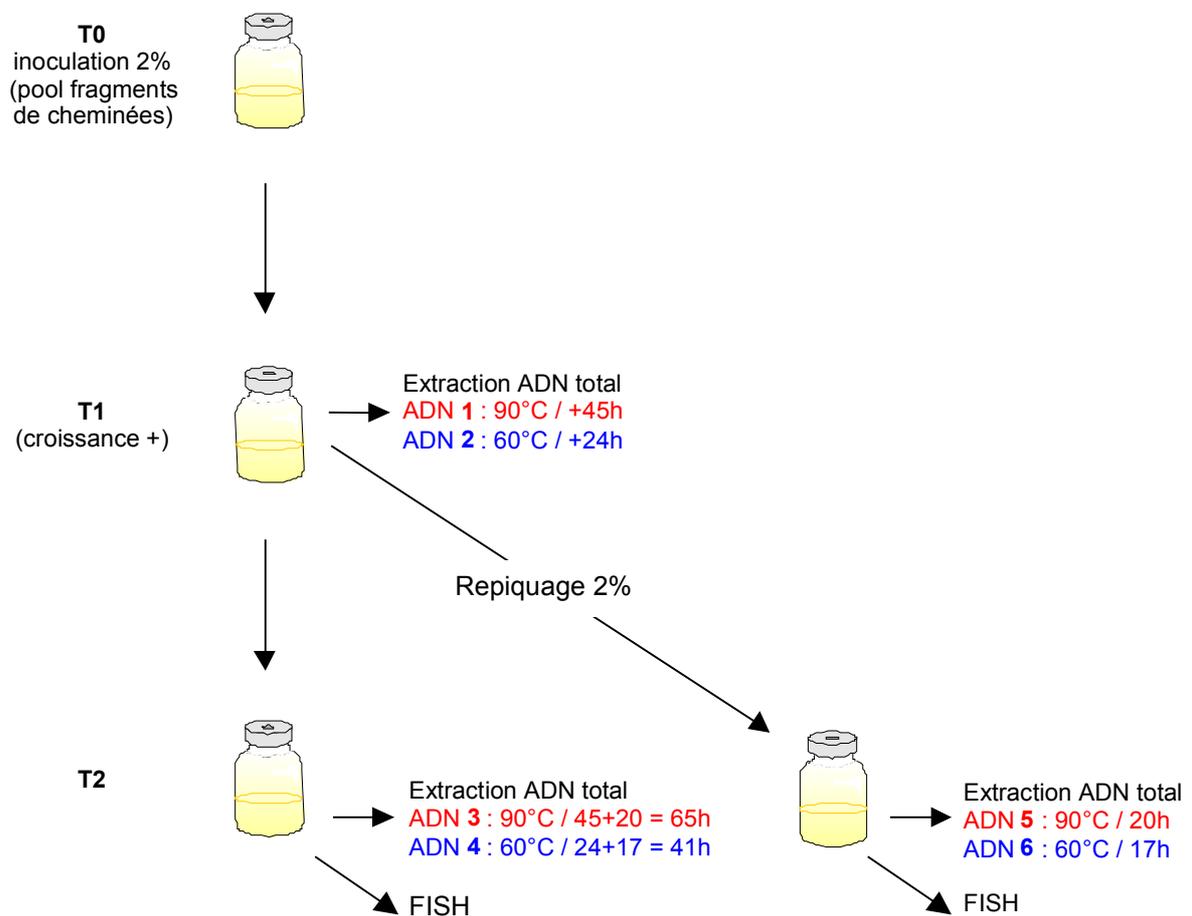


Figure 3 : Schéma du protocole de cultures d'enrichissement en flacon représentant les durées d'incubation, le repiquage et les prélèvements réalisés, et ce en parallèle pour les cultures à 60°C et à 90°C.

2.3 Culture en bioréacteur gas-lift

2.3.1 Les cultures en bioréacteur

Les microorganismes, notamment les hyperthermophiles anaérobies, sont de mieux en mieux connus d'un point de vue taxonomique mais leur culture en fermenteur reste à ce jour assez peu étudiée. Le développement des techniques de fermentation est aussi un maillon essentiel entre recherche scientifique et application industrielle. La culture en bioréacteur permet de travailler en grand volume à la différence des fioles ou des tubes, et permet également le contrôle des paramètres physico-chimiques tout au long de la culture. Différentes techniques de fermentation existent, le plus souvent utilisées pour la croissance d'une souche pure dont le but peut être (i) de produire en quantité un microorganisme (on parle de biomasse) pour son intérêt propre (e.g. la production de levures pour l'industrie viticole), (ii) de produire et de récupérer en quantité des enzymes natives et des métabolites que ces cellules contiennent ou libèrent (e.g. la production d'hormones par des microorganismes modifiés génétiquement), (iii) d'utiliser les microorganismes pour modifier un milieu (bio-transformation, e.g. de déchets agricoles).

☞ Il existe différentes techniques de culture en bioréacteur :

- **la culture en batch ou discontinue** : cette culture constitue un système clos où le milieu n'est pas renouvelé (il n'y a pas d'apport de nutriments en cours de culture). La croissance microbienne s'arrête lorsqu'un nutriment essentiel s'épuise ou que les conditions physico-chimiques deviennent létales (par ex : accumulation d'un métabolite toxique). Lorsqu'on vise une production de biomasse, la culture est arrêtée en général en fin de phase exponentielle de croissance; lorsque la biosynthèse d'un produit est recherchée, la culture est arrêtée dès que l'activité métabolique cesse.

- **la culture fed-batch ou semi-discontinue** : à partir d'un volume initial V_0 de culture active (fin de phase exponentielle), le milieu est apporté progressivement selon les besoins de la culture (débit programmé par intervalle de temps et couplé à la croissance microbienne), de manière à maintenir une croissance maximale, et ce jusqu'à atteindre un volume de culture égal au volume utile de la cuve. La cuve est alors vidangée, tout en laissant un volume initial V_0 de culture qui permettra d'initier un autre cycle d'expansion. Cette technique est très utilisée pour la production de levures de boulangerie.

- **la culture continue** : c'est un système dynamique dans lequel le milieu nutritif frais est apporté en continu et le milieu fermenté dans la cuve (i.e. la culture) est soutiré simultanément, à un même débit que l'apport du milieu frais. Le volume de milieu au sein de

la cuve est ainsi maintenu constant. Cette technique offre, dans un but de production, une efficacité nettement supérieure aux techniques de culture pré-citées.

Dans le cas de la culture en continu d'une souche pure à l'état stationnaire, le taux de croissance des microorganismes compense la dilution induite par l'apport de milieu. Cette dilution est quantifiée par le "**taux de dilution**" noté **D** exprimé en h^{-1} et se calcule :

$$D = V / Q \text{ où } - V \text{ est le volume du fermenteur (exprimé en L),}$$

$$- Q \text{ est le débit d'alimentation et de soutirage (exprimé en L. h}^{-1}\text{).}$$

L'inverse du taux de dilution est le **temps de résidence** (en h) qui est le temps qu'un microorganisme passe en moyenne dans un fermenteur avant d'être lessivé.

➔ Au cours de la **culture de thermophiles**, les températures élevées provoquent des réactions chimiques au sein des milieux de culture. Les nutriments peuvent réagir de façon abiotique. Certains acides aminés libres sont thermolabiles (glutamine, cystéine, asparagine, sérine, thréonine, tryptophane). Les sucres et les amines à température élevée, en particulier pour des pH neutres ou alcalins, peuvent réagir suivant des réactions de Maillard pour donner des produits bruns. Ces produits peuvent être inhibiteurs, et la carence en acides aminés et /ou en sucres peut limiter la croissance microbienne. Une température de culture élevée s'accompagne généralement d'une diminution de la viscosité, d'une augmentation de la solubilité des composés organiques et des polymères, et d'une diminution de la solubilité des gaz.

La culture des microorganismes (hyper-)thermophiles a nécessité la mise au point de nouveaux outils de fermentation, ou du moins la modification d'outils existant afin de répondre aux exigences liées au travail à haute température. Les milieux à base d'eau de mer et contenant du soufre sont particulièrement corrosifs. Des fermenteurs classiques ont été modifiés et utilisés pour réaliser des cultures à haute température en milieu corrosif :

- le fermenteur protégé par émail ("enamel-protected fermentor") utilisé entre autre pour cultiver *Thermotoga maritima* (Huber *et al.* 1986) ainsi que '*Nanoarchaeum equitans*' et son hôte du genre *Ignicoccus* (Huber *et al.* 2002) (équipe du Pr Stetter, Allemagne) ;
- fermenteur en INCOLOY®, alliage constitué d'inox spécial riche en titane, particulièrement résistant à la chaleur (LM2E - IFREMER Brest) : il a permis la production de biomasse de différentes *Thermococcales* destinée à la recherche d'ADN polymérase thermostables (Cambon-Bonavita *et al.* 2000, Quérellou 1999) ;
- fermenteur en verre équipé d'une platine en INCOLOY® et associé à un balayage gazeux (Chemap, B-Brown Scientific) (LM2E - IFREMER Brest) : il a servi à cultiver des membres des *Thermococcales* pour l'optimisation de la production de différentes enzymes (Gantelet & Duchiron 1998, Gantelet *et al.* 1998, Legin *et al.* 1998), ainsi qu'à la culture en continu et l'étude de la physiologie de *Pyrococcus abyssi* ST549 (Godfroy *et al.* 2000).

D'autres types de bioréacteurs ont été développés plus spécifiquement pour l'étude de microorganismes hyperthermophiles :

- le bioréacteur à agitation mécanique (développé par l'équipe du Pr Märkl en Allemagne) : cuve cylindrique munie d'une turbine d'agitation. Des vitesses d'agitation trop élevées (au-delà de 1800 rpm pour *P. furiosus*) peuvent inhiber la croissance : le stress mécanique provoque des forces de cisaillement qui s'exercent sur les parois cellulaires (Krahe *et al.* 1996).
- le bioréacteur à membrane : il est composé de deux chambres séparées par une membrane de dialyse. La culture se déroule généralement dans la chambre interne; la chambre externe contient le milieu de dialyse qui est apporté et soutiré en continu (1,2 L et 4,5 L respectivement (Krahe *et al.* 1996)). Les deux chambres peuvent être sous agitation et alimentées en gaz. Ce système permet une élimination en continu des inhibiteurs ou produits toxiques dissous au cours de la fermentation, et l'alimentation en substrats se fait *via* la membrane. La culture de *P. furiosus* dans ce type de réacteur a permis d'atteindre une concentration cellulaire de $35 \cdot 10^9$ cellules. mL⁻¹ !
- le gas-lift : voir ci-dessous.

2.3.2 Description du système de culture utilisant le bioréacteur gas-lift

Ce type de bioréacteur a été développé par le Dr N. Raven (UK) pour la culture de l'archée hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Un balayage gazeux efficace du milieu de culture a permis de cultiver *P. furiosus* en absence de soufre, grâce à une élimination continue de l'hydrogène produit par la souche, hydrogène dont l'accumulation provoque l'inhibition de la croissance. L'utilisation de ce bioréacteur pour la réalisation de cultures en continu (pouvant durer plusieurs semaines) a permis la production de biomasses importantes (jusqu'à 10^{10} cellules. mL⁻¹ à l'équilibre) (Raven *et al.* 1992, Sharp & Raven 1997). Un fermenteur de ce type a été acquis au laboratoire par le Dr A. Godfroy. Il a été utilisé pour la culture de différentes espèces de *Thermococcales* (Postec *et al.* 2005) et pour ce travail. La figure 6 représente schématiquement le fermenteur gas-lift. Le système de culture comporte les éléments suivants (voir aussi Figure 4) :

☞ La **cuve** en colonne (hauteur 425 mm, diamètre interne 98 mm) a été fabriquée par la société Radley's (UK). Elle est en verre borosilicaté et possède une double enveloppe permettant le chauffage du milieu, grâce à une circulation d'eau chaude, ou éventuellement d'huile pour des cultures à 100°C ou plus (bain-marie CC301, Huber). Le volume utile est de deux litres. Un cylindre en verre appelé "draft-tube" (hauteur 200, diamètre interne 64) est positionné à l'intérieur de la cuve et permet d'homogénéiser le bullage gazeux au sein du milieu de culture grâce aux courants de convection qu'il génère.



Figure 4 : Photo de la chaîne de fermentation. (a) gestion informatisée, (b) chromatographie phase gazeuse, (c) réservoirs d'acide et de base, (d) débit-mètre à bille, (e) condenseur, (f) cuve, (g) bullage du gaz en sortie de cuve, (h) bain-marie chaud associé à la cuve, (i) pompe péristaltique (les bidons de milieux frais et de soutirage de culture n'apparaissent pas sur cette photo).

➤ Le **balayage gazeux** de la culture à l'azote a pour but principal d'établir des conditions d'anaérobiose au sein du bioréacteur. Ce balayage favorise aussi l'homogénéisation du milieu de culture et permet l'élimination de produits de fermentation volatils (ex : H_2 , H_2S) potentiellement toxiques pour les microorganismes. Un diffuseur ou "sucré" en verre fritté (Rotaflo, UK), à la porosité optimisée, assure la distribution de l'azote stérile entrant dans la cuve du fermenteur sous forme de petites bulles. Il est fixé au fond de la cuve par un bouchon vissant en Téflon. Ce bulleur est relié à un débitmètre à bille (Aalborg, Monsey, New York) par l'intermédiaire d'un tuyau Pharmed (Masterflex, Norton) et d'un filtre 0,22 μm Acro50 (Gelman), relié à l'arrivée d'azote.

➤ Une **platine** en Téflon (Figure 5) est fixée sur la partie supérieure de la cuve grâce à un collier en inox. Elle est percée des entrées suivantes :

- une entrée centrale de 12 mm destinée à l'électrode de pH,
- deux entrées de 8 mm destinées à la sonde de température et à la sortie de l'effluent gazeux *via* un condenseur en verre,
- huit entrées de 5 mm de diamètre qui sont utilisées pour l'addition d'acide, de base, l'entrée de milieu et le soutirage de culture, le système de prélèvement et d'inoculation; par l'intermédiaire de tubes en verre.



Figure 5 : Platine en Téflon percée de 11 entrées.

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

➤ La **sonde de température** est une sonde classique PT 100 recouverte de Teflon PTFE (Radley, UK).

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

➤ Le **condenseur** (Radleys) est un condenseur classique de chimie, en verre. Il est relié à un bain réfrigérant (HS40, Huber) contenant de l'eau et un antigel dont la circulation continue permet la condensation des vapeurs d'eau de l'effluent gazeux en sortie de cuve, dues aux températures de culture élevées (60 à 90°C).

➤ Les **lignes** d'entrée et de sortie du milieu de culture sont réalisées en tuyaux Tygon®Silicone (Masterflex, Norton) qui assurent la liaison entre le bioréacteur et les deux bidons en polypropylène (Nalgène). Ces bidons, de 20 ou 50 litres, sont équipés d'un bouchon vissant percé de trois entrées dont un évent fermé par un filtre (0,22 µm, Gelman). Les entrées et sorties de milieu sont assurées par des pompes péristaltiques (Masterflex). La pompe d'entrée permet de fixer le débit d'arrivée du milieu, et ainsi le taux de dilution de la culture. Dans le cas de cette étude, le milieu frais contient du soufre, c'est pourquoi il est placé sous agitation afin de maintenir le soufre en suspension.

Les lignes d'entrée d'acide (HCl 1 N) et base (NaOH 1 N) sont réalisées de façon similaire (tuyaux Tygon®Silicone, pompe péristaltique, flacon Nalgène d'un litre avec bouchon vissant à trois entrées).

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

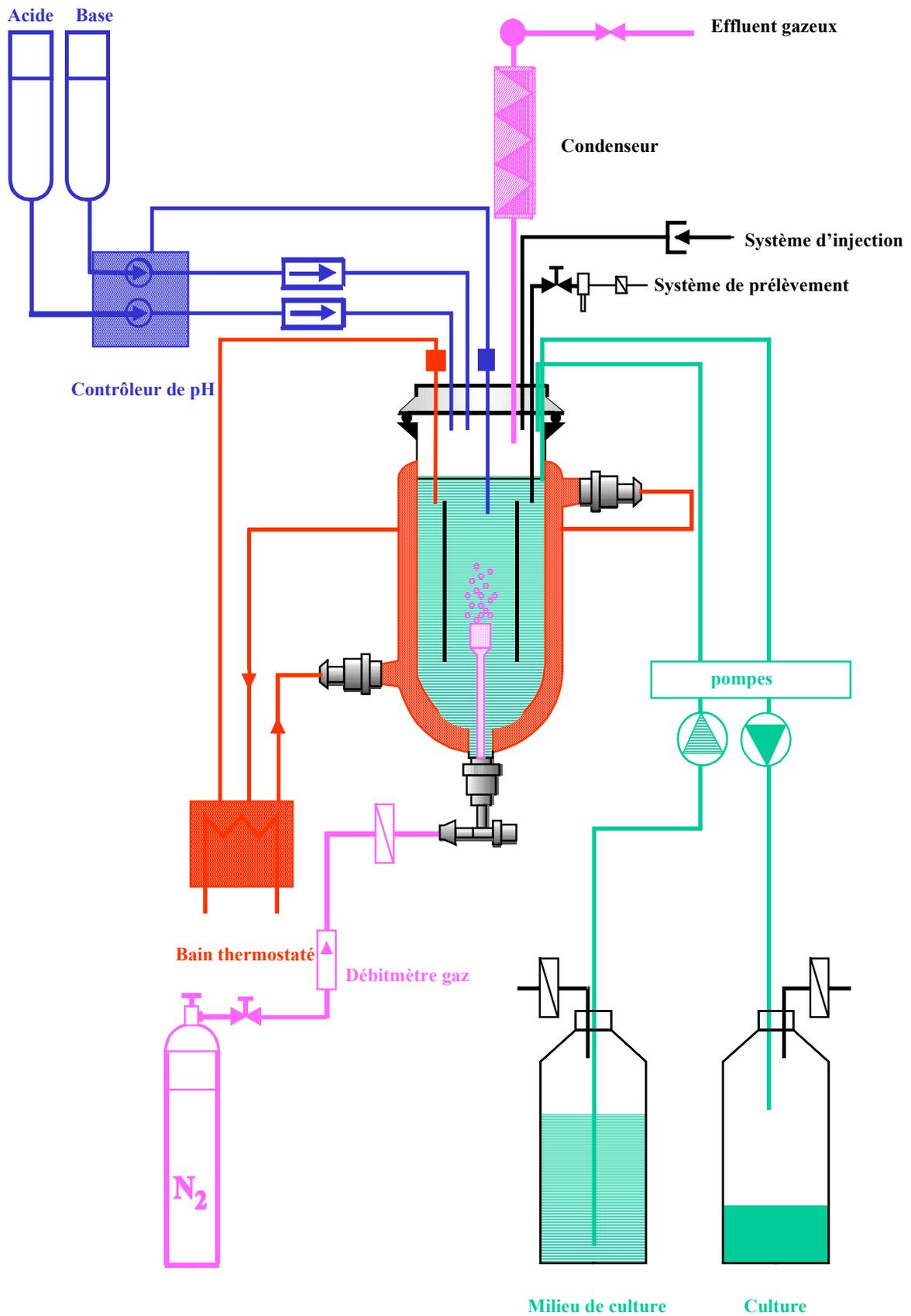


Figure 6 : Représentation schématique du fermenteur gas-lift et des équipements associés.

2.3.3 Conditions des cultures d'enrichissement réalisées en bioréacteur gas-lift.

Deux cultures d'enrichissement ont été réalisées, à 90°C et 60°C, sur une période de 45 et 50 jours respectivement. Les milieux ont été inoculés à 2% avec l'échantillon de cheminée AT2E1-8. Les cultures ont été réalisées à pH 6,5 et en présence d'un balayage gazeux à l'azote de 0.1 v.v.m⁻¹ (volume de gaz par volume de milieu et par minute), correspondant à un débit de 200 mL. min⁻¹. Le choix de l'azote a été guidé par une étude de l'archée hyperthermophile anaérobie *Pyrococcus furiosus* cultivée en fermenteur gas-lift qui montrait que la densité cellulaire la plus élevée (3. 10⁹ cellules. mL⁻¹) était obtenue avec l'azote (N₂) par rapport à d'autres gaz inertes (Ar, He, SF₆) (Raven *et al.* 1992). Le balayage gazeux le plus faible possible a été appliqué à nos cultures afin de maintenir l'anaérobiose, d'éliminer les produits volatiles de fermentation potentiellement toxiques (H₂ et H₂S entre autres) tout en minimisant les forces de cisaillement.

Pour chaque culture, une période initiale de batch de 34 h a été maintenue. La culture en continu a ensuite été établie par application d'un taux de dilution du milieu frais de 0,04 h⁻¹, correspondant à un débit de 80 mL. h⁻¹. Ce taux de dilution correspond aussi à un temps de renouvellement du milieu (i.e. le passage de 2 L de milieu) de 25 h. En fin de culture, l'effet du changement d'un paramètre sur la communauté microbienne cultivée a été testé : l'augmentation du débit par palier dans le cas de la culture à 90°C, ou l'augmentation de la température dans le cas de la culture à 60°C (voir Résultats).

2.4 Suivi des cultures

2.4.1 Prélèvement d'échantillons

Les cultures d'enrichissement en flacons ont été prélevées comme indiqué précédemment (voir 2.2.3) et les échantillons ont été traités en vue d'extractions d'acides nucléiques et d'hybridations au moyen de sondes oligonucléotidiques (voir ci-dessous).

Des échantillons des cultures d'enrichissement en bioréacteur ont été prélevés quotidiennement sur toute la durée des fermentations, et traités comme suit en fonction de leur utilisation future :

- 10 mL de culture ont été stockés en anaérobiose à 4°C en fiole pénicilline (dans le cas de la culture à 60°C) afin de pouvoir réaliser des sous-cultures et des isollements (voir paragraphe 2.5),
- huit cryotubes de 1,8 mL de culture ont été congelés à -20°C en présence d'un cryoprotecteur (5% de dimethyl sulfoxyde : DMSO) pour entreprendre des sous-cultures et isollements ultérieurs (voir 2.5),
- 2 mL de culture ont été conservés en présence de 2% de glutaraldéhyde à -20°C,
- 15 mL de culture ont été centrifugés (30 min à 8000 g). Les culots cellulaires ont été lavés avec une solution stérile de NaCl (23 g. L¹), repris dans 5 mL de tampon de lyse TE-Na 1X (Tris-HCl pH 8, 100 mM ; EDTA pH 8, 50 mM ; NaCl, 100 mM), et stockés à -20°C en vue d'une extraction d'acides nucléiques (voir paragraphes 3.1 et 3.3),
- 12 mL de culture ont été fixés pendant 2 h en présence de formaldéhyde 3% (v/v). Le culot de cellules fixées a été récupéré par centrifugation (10 min à 6000 g) puis rincé avec du tampon PBS (tampon phosphate : 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄, par litre d'eau distillée, pH 7,4), avant stockage dans un tampon PBS à 50% (v/v) d'éthanol à -20°C. Ces échantillons ont fait l'objet d'hybridations au moyen de sondes oligonucléotidiques (voir paragraphe 3.8),
- 1,5 mL de culture ont été centrifugés (10 min à 10 000 rpm) et le surnageant a été stocké à 4°C en vue des analyses par HPLC (voir paragraphe 2.4.3).

2.4.2 Dénombrement cellulaire

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

☉ L'observation en contraste de phase est parfois difficile, en particulier lorsque la densité cellulaire est faible et que le soufre est concentré dans le milieu. Dans ce cas, les

cellules ont été marquées avec un agent intercalant de l'ADN : le 4,6-diamidino-2-phenylindole (**DAPI**) et observées sous UV (longueurs d'ondes d'excitation : 365 nm, d'émission : 397 nm). Pour une observation directe, une goutte de culture (10 μL) est mélangée à 2 μL de DAPI (20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) sur du parafilm, puis déposée entre lame et lamelle, et observée en **épifluorescence**.

Cependant, les cellules de Thoma ne sont pas utilisables en épifluorescence. La méthode utilisée pour le dénombrement cellulaire consiste à réaliser des **filtres** comme suit :

- coloration de filtres blancs (porosité 0,22 μm , Nucléopore® - Costar) au Noir d'Irgalan pendant au moins une nuit par immersion, rinçage à l'eau distillée avant utilisation,
- marquage des cellules : 200 μL de culture (éventuellement diluée) + 200 μL de DAPI (20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) + 1,6 mL d'eau MilliQ stérile (volume total = 2 mL).
- la solution est filtrée sur le filtre Nucléopore teinté (face brillante au-dessus) à l'aide d'une tulipe de filtration et d'une pompe à vide,
- le filtre est ensuite séché, placé sur lame, recouvert d'huile à immersion pour épifluorescence (Olympus), puis recouvert d'une lamelle avant observation en microscopie à épifluorescence.

Le microscope est équipé d'une caméra vidéo et d'un écran qui facilitent le comptage. Les cellules sont comptées sur l'écran. La concentration cellulaire de l'échantillon de culture initial (C) est calculée à partir du nombre de cellules par écran (N), du nombre d'écrans couvrant la surface totale du filtre (G), de la dilution de la culture (d). Pour 1 mL de filtrat, le nombre de cellules par mL est : $C = N \times G \times d$.

☛ La cytométrie en flux

Les analyses ont été effectuées à la Station Biologique de Roscoff avec l'aide de Dominique Mari et à l'IUEM (UBO) avec Philippe Soudant.

Des analyses en cytométrie de flux ont été utilisées pour tenter notamment de dénombrer les cellules en fonction de leur morphologie (e.g. bacilles) à partir d'échantillons de culture du fermenteur.

Grâce à l'interaction d'un faisceau de rayons laser et de cellules en mouvement, la cytométrie en flux permet le dénombrement, la mesure des caractéristiques, voire le tri des cellules individuelles en suspension dans un courant d'eau saline (Figure 7a).

Les cultures microbiennes peuvent être analysées en cytométrie en flux après **marquage par un fluorochrome**. Les échantillons de culture fixés au glutaraldéhyde ont été décongelés et éventuellement dilués dans une solution stérile de NaCl 23g. L^{-1} , pour obtenir une concentration cellulaire comprise entre 10^3 et 10^6 cellules. mL^{-1} . Les cellules ont ensuite été marquées par un fluorochrome se fixant sur les acides nucléiques : le SYBR Green-I

(Molecular Probes) dont la solution commerciale est diluée 10 000 fois dans l'échantillon à analyser. L'intensité de la fluorescence de la cellule est considérée comme proportionnelle au contenu d'ADN.

Le **cytomètre de flux** (modèle FACSort Beckten Dickinson) est un appareil complexe permettant une interaction entre un flux de cellules et une source lumineuse. Les cellules en suspension sont soumises à une surpression et entraînée par un liquide de gaine (solution stérile de NaCl à 23 g. L⁻¹) (Figure 7b). Les cellules défilent devant une source d'excitation lumineuse (LASER) à un débit de 28 µL. min⁻¹ pour maintenir une détection inférieure à 600 événements / sec. Les cellules émettent alors des signaux optiques enregistrés par des détecteurs photosensibles. Le cytomètre en flux permet :

- l'analyse du faisceau transmis qui donne le nombre d'éléments (FALS = Forward Angle Light Scatter) → numération,
- l'analyse du faisceau lumineux diffracté qui reflète l'abondance du cytoplasme (RALS = Right Angle Light Scatter) → taille et morphologie de la cellule,
- l'analyse de la fluorescence émise par stimulation d'un fluorochrome marqueur : le SYBR Green-I émet une fluorescence "verte" à 488 nm et permet d'identifier, parmi les événements détectés, ceux correspondant à des cellules. Des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'un groupe taxonomique, et marquées par un fluorochrome, peuvent aussi être utilisées (des filtres lumineux et dichroïques permettent l'analyse simultanée de 3 couleurs en plus de la lumière blanche) → critère taxonomique.
- les cellules peuvent éventuellement être séparées physiquement, par exemple grâce à l'action d'un champ électrique.

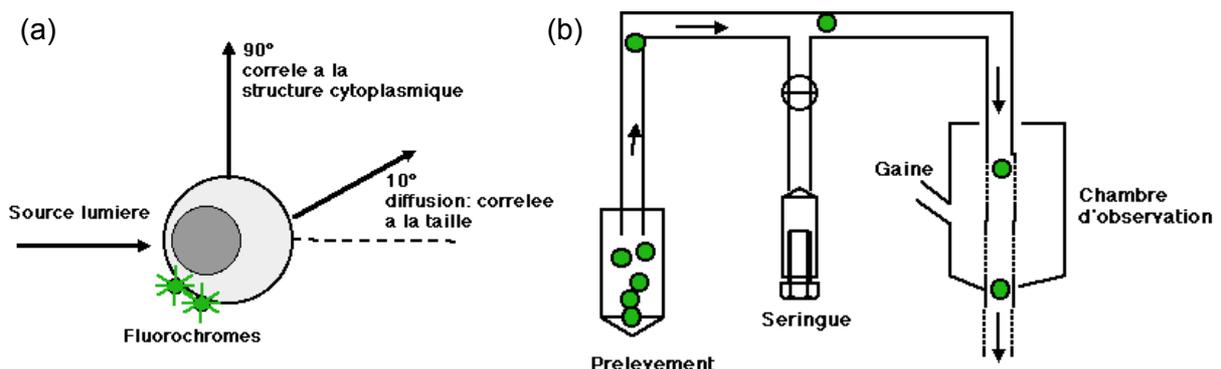


Figure 7 : (a) Flux de cellules dans une chambre d'analyse : lieu où le flux cellulaire est entouré par une gaine liquidienne extérieure et où il rencontre le rayon lumineux d'analyse ; (b) Interaction du faisceau lumineux et d'une cellule (www.anapath.necker.fr/).

2.4.3 Techniques analytiques

Deux techniques de chromatographie ont été utilisées pour l'analyse chimique des cultures : l'HPLC pour l'analyse des acides aminés, sucres et acides organiques, et la chromatographie phase gazeuse pour l'analyse des gaz en sortie du fermenteur.

- HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (réalisé par Patricia Pignet, Ifremer)

La chromatographie liquide haute performance est une méthode d'analyse et de séparation des produits d'un constituant à l'aide d'une phase mobile (l'éluant) le long d'une phase stationnaire (la colonne). Le modèle Waters 2690 utilisé comprend une pompe et un injecteur automatique. Chaque prélèvement de culture (0,5 – 1 mL) a été centrifugé 10 min à 10000 rpm afin d'éliminer les cellules. Le surnageant peut être stocké à 4°C, avant l'analyse par HPLC. Les protéines du surnageant sont précipitées à l'acide 5-sulfosalicylique pendant une nuit à 4°C, puis éliminées par centrifugation. Le surnageant récupéré est ensuite utilisé directement pour l'analyse des sucres, des acides organiques linéaires et aromatiques. A la différence des sucres et acides organiques, l'analyse des acides aminés nécessite une étape préparative de dérivation. Une solution d'éthanol / eau / triéthylamine (2/2/1) est ajoutée au surnageant. L'ensemble est séché sous vide dans un évaporateur concentrateur (Speedvac®), puis mis en présence d'une solution de dérivation éthanol / eau / triéthylamine / phényl-isothiocyanate (7/1/1/1). Après 10 min à température ambiante, l'échantillon est à nouveau séché dans les mêmes conditions. La dérivation consiste à greffer un groupement phényl-thiocarbamyle, afin de permettre la détection aux UV lors de l'analyse HPLC. Les conditions et les produits utilisés pour l'analyse HPLC sont ceux décrits dans la méthode PicoTag de la société Waters (WAT007360). Les conditions de l'analyse sont décrites dans le tableau 2.

Tableau 2 : Conditions de l'analyse HPLC des acides aminés, sucres et acides organiques.

Molécule analysée	Colonne / Température	Eluant, débit	Détection
Acides aminés	C18 / 47°C (NovaPack WAT 052840, Waters)	Gradient ternaire (WAT007360)	UV : 254 nm (UV 486, Waters)
Sucres et acides organiques linéaires	Exclusion H ⁺ / 60°C (polyspher OAKC 1.51270, Merck)	H ₂ SO ₄ 9 mM 0,35 mL. min ⁻¹	Réfractométrie (réfractomètre 410, Waters)
Acides organiques aromatiques	Exclusion H ⁺ / 65°C (28352, Chrompack)	H ₂ SO ₄ 4,5 mM 0,5 mL. min ⁻¹	UV : 210 nm (UV 486, Waters)

- Chromatographie phase gazeuse :

Les gaz en sortie du fermenteur ont été directement analysés en utilisant un microchromatographe de modèle MTI M200 (SRA Instruments). L'hydrogène, le CO₂ et le H₂S ont été détectés par conductivité thermique, mais non quantifiés. L'hydrogène a été détecté après passage sur une colonne à tamis moléculaire (Molecular Sieve) à 30°C, avec l'argon comme gaz vecteur. Le CO₂ et le H₂S ont été détectés par passage sur une colonne PoraplotU à 100°C, avec l'hélium pour gaz vecteur.

2.5 Sous-cultures et isoléments

Des sous-cultures ont été réalisées en flacon avant de tenter d'isoler des microorganismes détectés dans les cultures d'enrichissement. Pour ce faire, le milieu d'enrichissement "F1" a été utilisé de nouveau. Cependant, ce milieu a été modifié de différentes manières afin de cibler la culture de certains microorganismes. Les modifications du milieu "F1" sont précisées de manière appropriée dans le chapitre "Résultats". Les prélèvements de culture d'enrichissement stockés à 4°C en anaérobiose ou à -20°C en présence de DMSO ont servi d'inoculum pour ces cultures.

2.5.1 Isolement par séries de dilution

Des dilutions en série ont été effectuées en inoculant 9 mL de milieu en tube de Hungate avec 1 mL de culture d'enrichissement (dilution au 10^{ème}). Cinq dilutions successives au 10^{ème} ont été réalisées dans un premier temps, suivies de 10 dilutions au demi, soit une dilution finale (théorique) de $9,7 \cdot 10^{-9}$ (Figure 8). En théorie, la culture observée pour la dilution la plus importante correspond à une souche isolée.

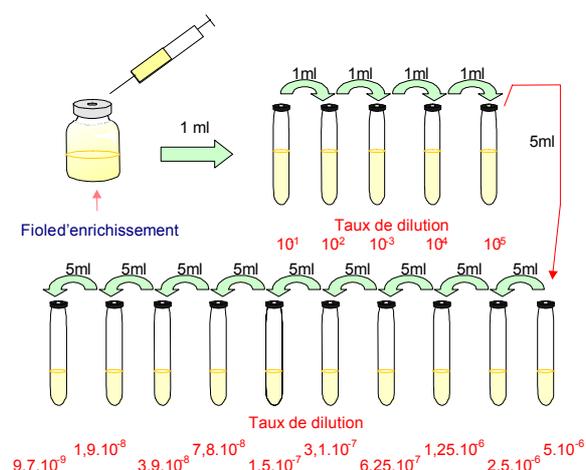


Figure 8 : Schéma d'une série de dilution.

2.5.2 Isolement par étalement sur boîte

Le milieu de culture liquide est additionné d'un agent gélifiant : l'agar pour des cultures en condition mésophile, ou le Phytigel[®] à 1,5% (Sigma) pour des cultures en condition thermophile. Le pouvoir gélifiant du Phytigel[®] se maintient à des températures élevées (100°C contre 65°C pour l'agar classique). Dans le cas de cultures en anaérobiose, les milieux contenant l'agent gélifiant sont réduits dès leur sortie de l'autoclave par addition de 20 mL · L⁻¹ de Na₂S à 2,5% (concentration finale : 5 mg · L⁻¹), et coulés immédiatement dans des boîtes de Petri en verre préalablement stérilisées (four Pasteur). Ces milieux doivent être coulés très chauds car ils gélifient pour des températures inférieures à 80°C. Dans l'enceinte anaérobie, les boîtes de milieux sont ensuite inoculées par étalement en stries d'environ 200 µL de culture, puis placées dans des bocaux en verre contenant un dessiccateur de type Silicagel pour piéger l'humidité (l'évaporation des milieux est importante à la surface des milieux gélosés lors d'une incubation à température élevée). Les bocaux sont hermétiquement fermés dans l'enceinte anaérobie et contiennent donc le mélange gazeux N₂/H₂/CO₂ (90/5/5). Puis ils sont incubés dans les étuves aux températures désirées.

3 Techniques moléculaires

3.1 Extraction d'ADN total

L'extraction de l'ADN total comprend trois étapes :

- **la lyse cellulaire** : une combinaison de traitements enzymatiques et chimiques permet de lyser les cellules. Le culot cellulaire repris dans 5 mL de tampon de lyse TE-Na 1X (Tris-HCl pH 8, 100 mM ; EDTA pH 8, 50 mM ; NaCl, 100 mM) est additionné de :

- 500 µL de Sarkosyl (N-Laurylsarcosine) 10% (w/v),
- 500 µL de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10%,
- 100 µL de protéinase K à 20 mg. mL⁻¹.

Après une première incubation de 1h30 à 45°C, le surnageant est récupéré par centrifugation 20 min à 6000 g. Le culot cellulaire remis en présence de tampon de lyse, de Sarkosyl, de SDS et de protéinase K dans les mêmes proportions est de nouveau incubé à 45°C pendant 2h30. Le surnageant est récupéré de la même façon et additionné au précédent. Une observation microscopique au terme de ces deux étapes de lyse permet de s'assurer qu'il ne reste plus de cellules intactes.

- **l'élimination des protéines et débris cellulaires, et l'extraction de l'ADN** par utilisation de solvants (phénol, chloroforme, acide isoamylique). Après séparation des phases par centrifugation, la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN est recueillie. Un dernier traitement au chloroforme permet d'éliminer les traces de phénol qui pourraient inhiber certaines réactions enzymatiques nécessaires par la suite.

Le surnageant total contenant l'ADN est traité par :

- ajout d'un volume de PCI (phénol /chloroforme /acide isoamylique : 24/25/1) tamponné à pH8, agitation par retournement 2 ou 3 fois, centrifugation 25 min à 8000 g, récupération de la phase aqueuse supérieure (les protéines et débris cellulaires forment un précipité blanc à l'interface),
- renouvellement de l'opération une deuxième fois, et si un précipité apparaît à l'interface, recommencer l'opération une troisième fois,
- ajout d'un volume de chloroforme, agitation par retournement 2 ou 3 fois, centrifugation 35 min à 8000 g, récupération de la phase aqueuse supérieure.

- **la précipitation de l'ADN** : après extraction aux solvants, la phase aqueuse est additionnée de 2 volumes d'éthanol à -20°C, homogénéisée par retournements successifs. Si le précipité d'ADN n'apparaît pas immédiatement, le mélange est placé 30 min à -80°C ou une nuit à -20°C. Alternativement, l'éthanol peut être remplacé par 0.7 volume d'isopropanol à -20°C. Si l'ADN est supposé être en faible quantité, on peut à cette étape (i) ajouter de l'ADN eukaryote de sperme de hareng (200 µ g) (s'il n'est pas gênant pour l'utilisation ultérieure de l'ADN) (Juniper *et al.* 2001); (ii) et / ou ajouter un sel, l'acétate de sodium

(AcNa 3M, pH 5,2) dont le rôle anti-chaotropique favorise la précipitation de l'ADN (volume AcNa 3M = 1/10^e du volume de solution aqueuse contenant l'ADN après extraction).

L'ADN est récupéré par centrifugation 35 min à 10 000 g. Le culot d'ADN est séché à l'air à température ambiante, repris dans de l'eau MilliQ stérile ou du tampon TE 1X (10 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7.5), et stocké à 4°C.

- **contrôle** : une migration de l'ADN par électrophorèse permet de contrôler la qualité de l'ADN extrait, de visualiser une éventuelle dégradation, et d'en estimer la quantité. On réalise un gel d'agarose 0,8% dans du TAE 1X contenant 0,8 µg. mL⁻¹ de bromure d'éthidium (BET). La migration s'effectue pendant 30 min à 90V : l'ADN chargé négativement migre vers l'anode. Un marqueur, mélange de fragments d'ADN de tailles connues, migre parallèlement à l'ADN étudié et sert de référence de taille. Le BET s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN et permet de visualiser les ADN dans le gel sous UV (Fluor-S-Multimager de BioRad).

3.2 Amplification des gènes par PCR

Cette technique a été employée à plusieurs étapes de l'analyse moléculaire, pour amplifier des gènes d'ADNr 16S à partir :

- d'ADN totaux, extraits de la cheminée hydrothermale ou de cultures d'enrichissement, en vue d'une séparation des différents fragments amplifiés par DGGE ou clonage,
- de fragments d'ADNr 16S, extraits de gel DGGE ou clonés,
- d'ADNc obtenus par RT-PCR,
- d'ADN totaux de souches isolées en vue d'une identification de la souche par séquençage.

➤ **Le milieu d'amplification** contient :

- Tampon 10X (Qbiogen)*	5µL (1 X final)
- dNTPs (Eurogentec, 20 mM total)	2µL (200 µM final pour chaque)
- Amorces sens	100 pmol
- Amorces anti-sens	100 pmol
- <i>Taq</i> polymérase (Qbiogen, 5U. µL ⁻¹)	0,25 à 0,5 µL
- Matrice ADN	≈ 100 ng
- Eau MilliQ stérile	QSP 50µL

*Le tampon (Qbiogen) contient 10 mM de Tris-HCl pH9, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1% de Triton X 100 et 0,2 mg. mL⁻¹ de BSA (Bovin Serum Albumin).

Pour amplifier des fragments clonés, les cellules d'*E. coli* transformées sont prélevées d'une colonie sur boîte, remises en suspension dans 200 µL d'eau stérile, et 2 µL de cette suspension sont ajoutés au mélange d'amplification.

➤ Le **cycle** suivant a été réalisé grâce au Robocycler Gradient 96 (Stratagene) :

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

* la température d'hybridation appliquée dépend du couple d'amorces utilisé. Elle est choisie généralement à $T_d - 5^\circ\text{C}$, T_d étant la température de demi-dénaturation de l'amorce dépendant de sa composition en base. La relation suivante en donne une approximation utilisable pour des amorces inférieures à 18 oligonucléotides (elle ne tient pas compte de la concentration en sels) : $T_d = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$.

➤ Les **amorces** suivantes (Tableau 3) sont utilisées pour les différentes réactions d'amplification.

➤ En vue de l'analyse par **DGGE**, des amorces spécifiques des domaines *Archaea* (344F-GC et 915R (Casamayor *et al.* 2000)) et *Bacteria* (341F-GC et 907R (Muyzer *et al.* 1993, Muyzer & Smalla 1998)) ont été utilisées pour l'amplification par PCR de la région variable v3 de l'ADNr 16S. Ces amorces ont pour particularité de posséder un "GC-clamp" (Figure 9). Elles sont utilisées à raison de 50 pmol par réaction de PCR, dans un volume réactionnel total de 100 μL .

La PCR a été réalisée grâce à des cycles en "touchdown" : la température d'hybridation est abaissée d'un degré tous les deux cycles pour les 20 premiers cycles, et les 15 derniers cycles sont réalisés à la température la plus basse (= la température d'hybridation attendue). Les gammes de températures utilisées sont : 71 à 61°C pour l'amplification des ADNr archéens, et 65 à 55°C pour l'amplification des ADNr bactériens. Cette procédure réduirait la formation des sous-produits aspécifiques (Don *et al.* 1991, Muyzer *et al.* 1993). Les produits amplifiés ont été vérifiés sur gel d'agarose 0,8% (voir 3.1 "contrôle").

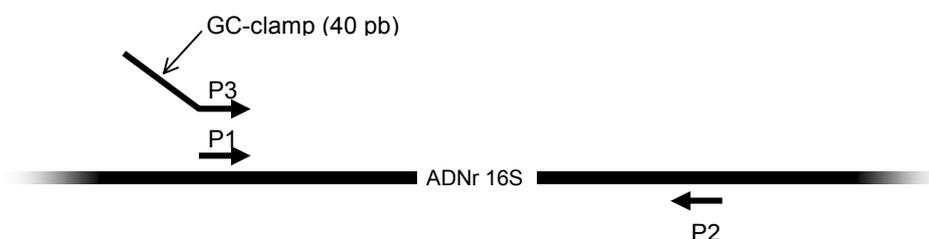


Figure 9 : Schéma de la région d'ADNr amplifiée par PCR dans cette étude. Les amorces 1 et 2 amplifient un fragment d'environ 570 pb de l'ADNr 16S de *E. coli*. L'amorce 3 correspond à l'amorce 1 avec incorporation en 5' d'un "GC-clamp" de 40 pb.

Tableau 3 : Listes des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de fragments d'ADNr 16S archéens et bactériens, en vue de DGGE et de clonage. S = amorces "sens", AS = amorces "anti-sens". En gras apparaît le "GC-clamp" de 40 pb spécifique aux amorces sens de DGGE. Les appellations alternatives des amorces apparaissent en italique. La position des amorces correspond à *Escherichia coli* (pour les amorces "Bacteria") et à *Thermococcus celer* (pour les amorces "Archaea"). Certaines amorces sont dégénérées : Y = C ou T ; M = A ou C ; R = A ou G ; W = A ou T.

	Amorces	Sens	Position	Séquences
<i>Archaea</i>	A24F (<i>Aa dir</i>)	S	8	5' CGG TTG ATC CTG CCG GA 3'
	A23SR (<i>23 SA rev</i>)	AS	1900	5' CTT TCG GTC GCC CCT ACT 3'
<i>Bacteria</i>	E8F (<i>Sa dir</i>)	S	8	5' AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG 3'
Universelles	U1407R	AS	1407	5' GAC GGG CGG TGW GTR CAA 3'
	U1492R (<i>S17rev</i>)	AS	1492	5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'
Amorces internes ^a	16S dir2	S	420	5'-ATT ATT GGG CCT AAA GCG-3'
	16S dir3	S	730	5'-AGG GAA GCC GTT AAG CCC GC-3'
	16S dir4	S	1060	5'-ACG GTA GGT CAG TAT GCC CC-3'
	S4dir	S	342	5'-CTA CGG GAG GCA GCA G-3'
	S8dir	S	684	5'-GTA GCG GTG AAA TGC GTA GA-3'
	S12dir	S	1099	5'-CAA CGA GCG CAA CCC TT-3'
DGGE	344F-GC	S	344	5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GAC GGG GYG CAG CAG GCG CGA-3'
	915R	AS	915	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'
	341F-GC	S	341	5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'
	907R	AS	907	5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'
Clones	M13F (<i>M13dir</i>)	S	-96 ^b	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
	M13R (<i>M13rev</i>)	AS	+72 ^c	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

^a les amorces internes ont été utilisées dans le cas du séquençage complet d'ADNr 16S, issus de souches isolées en particulier.

^b position de M13F sur le vecteur de clonage en amont du site d'insertion.

^c position de M13R sur le vecteur de clonage en aval du site d'insertion.

3.3 Extraction d'ARN totaux et RT-PCR

L'extraction des ARN totaux, la RT-PCR et l'amplification des ADNr 16S ont été utilisées dans le but d'accéder à des séquences ribosomales de microorganismes actifs.

Les différentes étapes sont : l'extraction des ARN totaux à l'aide de la solution "RNA Now", le traitement à la Dnase, la PCR de contrôle d'absence d'ADN, la reverse transcription et la PCR (Annexe 1).

3.4 DGGE

Les fragments de PCR amplifiés avec des amorces de DGGE spécifiques de la région v3 des ADNr 16S archéens et bactériens ont été analysés sur gel de polyacrylamide comportant un gradient de dénaturant, en utilisant l'appareillage Dcode de Bio-Rad (Muyzer *et al.* 1993).

➤ Dans l'étape d'**optimisation**, des gels perpendiculaires ont pu être réalisés : contrairement au gel dont la préparation est décrite ci-dessous, la direction de la migration est perpendiculaire au gradient, et non plus parallèle. Un seul échantillon est déposé sur un gel "perpendiculaire". L'expérience permet de déterminer les conditions de dénaturation du produit testé. Dans le cas de gels "parallèles", il convient dans un premier temps de tester une large gamme de conditions dénaturantes, en utilisant par exemple des solutions à 20% et 80% de dénaturant, avant de restreindre cette gamme autour des conditions permettant la meilleure séparation des fragments.

➤ Des produits **standards** ont été préparés de la façon suivante. Les ADN totaux ont été extraits, avec le protocole décrit au paragraphe 3.1, à partir de cultures en phase exponentielle d'archées : *Thermococcus hydrothermalis* CNCMI-1319, *Thermococcus fumicolans* CIP 104680, *Pyrococcus abyssi* CNCMI-1302 et *Pyrococcus glycovorans* CNCMI-2120, et des cultures en phase exponentielle de *Bacteria* : *Caloranaerobacter azorensis* MV1087, *Marinitoga camini* MV1075 et *Thermosipho melanesiensis* CIP 104789. Ces souches de référence ont été choisies parmi les souches hydrothermales océaniques capables de pousser en hétérotrophie et en conditions thermophiles. A partir de chacun de ces ADN totaux, les ADNr 16S ont été amplifiés par PCR avec les amorces DGGE (voir 3.2). Un mélange des produits de PCR archéens et un mélange des produits bactériens ont été utilisés en routine comme marqueurs standards sur l'ensemble des gels DGGE réalisés. D'autres standards ont également été testés à partir de ces cultures, et préparés avec les modifications suivantes :

- mélange des cultures pures avant extraction de l'ADN total,
- mélange des ADN totaux (extraits séparément à partir de chaque culture pure) avant PCR.

☞ Les échantillons ont finalement été chargés sur un gel de polyacrylamide à 6 ou 8% (w/v) dans du TAE 1 X comportant :

- un gradient de dénaturant de 50 à 80% d'urée et formamide (UF) pour l'analyse des fragments archéens,
- un gradient de 35 à 80% UF pour l'analyse des fragments bactériens.

NB : 100% UF correspondent à 7M d'urée et 40% (v/v) de formamide.

☞ Une gamme de solutions contenant différents pourcentages de dénaturant a été utilisée (Tableau 4). Ces solutions sont préparées au préalable et stockées à 4°C.

Tableau 4 : Composition des solutions dénaturantes utilisées pour la réalisation des gels de DGGE.

% dénaturant	0	35	50	80	100
Acrylamide/Bis (37,5 :1) 40% (Biorad) ^a	15	15	15	15	15
TAE 50X (Biorad) ^b	1	1	1	1	1
Formamide déionisé (Sigma)	0	14,7	21	33,6	42
Urée (Sigma)	0	14,7	21	33,6	42
H ₂ O MilliQ QSP	100	100	100	100	100

^a Acrylamide : N, N'-Méthylbisacrylamid (37,5 :1) (substance cancérigène et neurotoxique).

^b TAE 1x : 40 mM Tris, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA, pH 8,3.

☞ La réalisation d'un gel comporte les étapes suivantes :

- nettoyage des plaques à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau distillée puis à l'éthanol, séchage et essuyage soigneux.

- montage des deux plaques et des deux "spacers" (pièces d'écartement, 1 mm).

- **gel "bouchon"** (facultatif). Il est coulé à la pipette dans un but d'étanchéité, et contient : 1 mL de solution d'Acrylamide/Bis à 0% de dénaturant + 10 µL d'APS (ammonium persulfate, BioRad) à 100 mg. mL⁻¹ (aliquot décongelé extemporanément) + 10 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetraméthyl-ethylenediamine, BioRad). La matrice est créée par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. La grosseur des pores formés est fonction de la concentration d'acrylamide. Plus la concentration est élevée, plus les pores seront petits.

- **gel dénaturant**. Ce gel est coulé à l'aide d'un "formeur de gradient" : c'est un système à deux colonnes, l'une contenant la solution la plus dénaturante, l'autre la solution la moins dénaturante, qui permet la réalisation d'un gradient de dénaturant au sein du gel. Chaque colonne contient : 12 mL de solution dénaturante + 12 µL de TEMED + 120 µL d'APS (100 mg. mL⁻¹). L'ensemble est placé sous agitation. L'ouverture du robinet de jonction amorce le mélange des solutions : la solution la plus dénaturante est progressivement diluée par la moins dénaturante (⇒ gel plus dénaturant en bas, moins dénaturant en haut). Le gel est coulé *via* un tuyau Masterflex associé à une pompe péristaltique et branché à une aiguille (Ø

0,8 mm) introduite entre les plaques . La vitesse de la pompe est fixée à 5 mL. min⁻¹ ce qui permet une bonne formation du gradient avant que les solutions ne polymérisent. La surface du gel est recouverte de butanol saturé en eau (environ 1 mL) car le polyacrylamide ne polymérise pas au contact de l'air. La polymérisation a lieu à 16°C pendant 4h.

- **gel de concentration** ("stacking") ou gel d'entassement. Il sert à regrouper les acides nucléiques. Le butanol est rincé à l'eau distillée. Le gel de concentration est coulé à la pipette et contient : 5 mL de solution d'Acrylamide/Bis à 0% de dénaturant + 50 µL d'APS (100 mg. mL⁻¹) + 50 µL de TEMED. Le peigne permettant la formation de 16 puits (volume d'un puits : 30µL) est inséré dans ce gel entre les plaques. La polymérisation a lieu à 16°C pendant 1h.

- **dépôts et migration** : une fois le peigne ôté, les puits doivent être soigneusement rincés au tampon TAE 1X. Les plaques sont fixées à leur support, le tout est placé dans la cuve remplie de TAE 1X (≈ 7L) préchauffé à 60°C. Les produits PCR sont mélangés à une solution de dépôt. Le volume total ne doit pas dépasser 30 µL. La quantité d'ADN doit être homogène dans tous les puits, dans la mesure du possible. Une pompe et une agitation magnétique assurent une circulation du tampon dans la cuve et ainsi, une homogénéisation de la température. L'électrophorèse est réalisée pendant 16 h à 70 V.

- **révélation** : les gels ont été colorés 15 min dans un bain de BET (0,5 mg. L⁻¹), rincés 15 min à l'eau distillée, puis visualisés et photographiés sous UV (Fluor-S-Multimager de BioRad).

- **découpage des bandes et réamplification des fragments**. Les bandes ont été découpées sous UV avec des lames stériles. Les ADN de chaque bande ont été élués pendant une nuit à 4°C dans 50 µl d'eau stérile (ou TE 1X) en tube Eppendorf. Un microlitre de l'ADN élué correspondant à chaque bande découpée a été réamplifié en suivant la procédure précédemment décrite (3.2). La migration d'un aliquot de ces produits de PCR a été réalisée en gel de DGGE comme décrit ci-dessus. Les produits de PCR fournissant une seule bande à la même hauteur que la bande d'origine ont été purifiés sur colonnes QIAquick (Qiagen) puis séquencés.

3.5 Clonage

Des banques de clones ont été construites en utilisant le kit TOPO TA cloning (Invitrogen®) à partir des pools d'ADNr 16S amplifiés par PCR et obtenus à partir de :

- l'échantillon de cheminée AT2E1-8,
- deux échantillons de chacune des cultures d'enrichissement en fermenteur gas-lift à 90°C et 60°C, collectés à T7 et T28, i.e 7^e jour et 28^e jour,
- trois échantillons des cultures d'enrichissement en flacon collectés à deux temps distincts, et après repiquage (décrit plus haut : 2.2.3), et ce pour chacune des températures : 90°C et 60°C.

Le principe du clonage à l'aide de ce kit repose sur une activité de la *Taq* polymérase qui ajoute une désoxyadénosine (A) aux extrémités 3' des brins néosynthétisés. Le vecteur linéarisé possède une déoxythymidine (T) en 3', ce qui permet une ligation efficace du produit de PCR avec le vecteur, grâce à l'action d'une topoisomérase à température ambiante.

Le protocole de clonage dans le vecteur pCR 2.1-TOPO et de transformation est celui décrit par le fabricant (voir aussi Annexe 2). Les étapes sont les suivantes :

- ligation : le plasmide pCR®2.1-TOPO linéarisé se referme sur un fragment amplifié par PCR. Ce plasmide possède deux gènes de résistance, à l'ampicilline et à la kanamycine, un gène lac Z qui code pour la β -galactosidase et contient le site d'insertion, et des sites d'hybridation pour les amorces M13F et M13R.
- transformation : le vecteur est inséré dans une cellule hôte compétente : *E. coli* TOP10F' (One Shot®). La perméabilisation de la membrane est obtenue par choc thermique et par action du β -mercaptoéthanol.
- mise en culture des cellules transformées sur milieu LB gélosé contenant 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ d'ampicilline. Un étalement d'IPTG, inducteur du gène de la β -galactosidase, et de X-gal, substrat de la β -galactosidase, est réalisé sur les milieux gélosés avant inoculation, et incubation (15-20 h) à 37°C.

Milieux et solutions :

- milieu LB (Luria Bertani) : 10 g. L⁻¹ tryptone, 5 g. L⁻¹ d'extrait de levure, 10 g. L⁻¹ de NaCl.
 - milieu LB gélosé : milieu LB + 15 g. L⁻¹ d'agar avant autoclavage.
 - IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) : 100 mM
 - X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside) : 40 mg. mL⁻¹ dans du diméthylformamide.
- analyse des clones : l'ampicilline ajoutée dans le milieu LB gélosé permet de sélectionner la croissance des cellules effectivement transformées par le vecteur, qui est porteur du gène de résistance à cet antibiotique. La sélection des cellules possédant le plasmide recombiné se fait par la couleur des colonies. Lorsque le plasmide ne possède pas l'insert, le gène Lac Z n'est pas interrompu et la β -galactosidase est exprimée (par induction à l'IPTG). La

β -galactosidase hydrolyse le X-Gal, ce qui génère un produit bleu. Lorsque l'insert est présent, le gène Lac Z est interrompu, il n'y a pas de production de β -galactosidase dans ce cas et les colonies obtenues sont blanches. Une incubation des boîtes de clones $\frac{1}{2}$ journée à température ambiante ou 2 h à 4°C facilite la lecture du criblage blanc/bleu. Les colonies blanches sont repiquées sur milieu LB gélosé (contenant de l'ampicilline et recouvert de Xgal et IPTG, voir ci-dessus) pour vérifier la couleur des colonies. Les colonies blanches sont repiquées parallèlement sur milieu LB (+ ampicilline) pour conservation des clones.

- vérification de la présence de l'insert : les colonies sont reprises dans 100 μ L à 1 mL d'eau Milli-Q stérile. Les fragments insérés sont amplifiés par PCR à l'aide des amorces M13F et M13R (25 pmol de chaque, température d'hybridation : 55°C). La taille de l'insert est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (voir 3.2 et 3.1).

3.6 Séquençage

Selon le nombre de réactions de séquence à réaliser, la stratégie employée est différente.

➤ Pour un nombre réduit de réactions de séquence, le séquençage a été réalisé par la société Genome Express S.A. (Grenoble). C'est le cas :

- des fragments d'ADN obtenus par DGGE,
- de réactions de PCR isolées,
- de **clones** cultivés en tubes 15-20 h à 37°C dans 2 mL de LB 2X (10 g. L⁻¹ tryptone, 5 g. L⁻¹ d'extrait de levure, 10 g. L⁻¹ de NaCl) contenant 50 μ g. mL⁻¹ d'ampicilline. Les plasmides ont été extraits pour chaque culture avec le kit QIAprep Miniprep (Quiagen).

➤ Pour un grand nombre de réactions de séquences (> à 96 réactions), le travail a été effectué en microplaque de 96 puits qui ont été traitées à la plate-forme OUEST-Génopole à Roscoff (<http://www.sb-roscoff.fr/SG/>).

- dans le cas de **produits de PCR**, ils ont été purifiés à l'aide du Kit de purification "Montage PCR96 Cleanup Kit" (Millipore) avant la réaction de séquence (PCR) et le séquençage.

- dans le cas de **clones**, ils ont été cultivés pendant 15-20 h à 37°C sur microplaque Deepwell de 96 puits, dans 1 ml de milieu LB 2X + ampicilline (voir ci-dessus). Les plaques ont ensuite été centrifugées, à 4000 rpm pendant 15 min. Les culots cellulaires ont été conservés à -20°C. Les plasmides ont été extraits et purifiés en utilisant le kit "Montage Plasmid Miniprep₉₆" (Millipore).

a) la réaction de séquence (PCR).

Le principe du séquençage est celui développé par Sanger et basé sur l'incorporation de didésoxynucléotides. Une réaction de PCR est couplée à ce principe pour amplifier le signal. La polymérase permettant l'amplification du gène d'intérêt est mise en présence d'oligonucléotides non marqués (dNTP) et de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués par des fluorochromes différents selon leur nature. L'incorporation d'un ddNTP entraîne l'arrêt de l'élongation. Ainsi, on obtient théoriquement des séquences d'ADN de toutes tailles dont le dernier nucléotide est fluorescent.

La réaction de séquence utilise la chimie du "Big Dye Terminator" (Applied Biosystem) selon les recommandations du fabricant. La solution commerciale "Big Dye Terminator V3.1" contient les dNTP, les ddNTP marqués ainsi que l'ADN polymérase. Le mélange réactionnel pour une réaction contient : le tampon de dilution du Big-Dye : 0,75 µL, la solution Big-Dye V3.1 : 0,5 µL, l'amorce : 5 pmol, l'ADN (ADN génomique : 1,5 à 2 µg ou produit PCR : 30 à 50 ng ou plasmide : 100 ng), et l'eau Milli-Q stérile : qsp 5µL. Les amorces utilisables sont présentées au paragraphe 3.2 (Tableau 5). La réaction s'effectue sur un thermocycleur dans les conditions suivantes :

Tableau 5 : Cycle de PCR pour la réaction de séquence.

température	94°C	55°C	60°C	4°C
1 cycle	5 min	x	x	x
50 cycles	30 sec	30 sec	4 min	x
1 cycle	x	x	x	infini (99:59)

Les produits amplifiés sont ensuite purifiés avec le kit "Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup" (Millipore).

L'utilisation du robot pipeteur "Tecan Genesis 150" permet le traitement simultané de 4 plaques de 96 puits, et peut prendre en charge : l'extraction de plasmides, la répartition du mélange réactionnel et l'addition de l'ADN pour la réaction de séquence, la purification des produits amplifiés.

b) le séquençage.

Il a été réalisé grâce à un séquenceur automatique (Abi prism 3100[®] GA, Applied Biosystem) composé principalement d'un faisceau de 16 capillaires, d'une anode, d'une cathode, et d'une cellule de détection (LASER) (voir Figure 10). Le produit d'amplification y est analysé. La séparation des fragments d'ADN à un nucléotide près s'effectue par électrophorèse dans un polymère (POP4 ou POP6) circulant à l'intérieur des capillaires. Le faisceau de capillaires passe ensuite devant un faisceau LASER qui excite les

fluorochromes. En fonction de la longueur d'onde émise, le marqueur et donc le nucléotide est identifié, et la séquence est reconstituée.

La longueur des capillaires (36, 50 ou 80 cm) est choisie en fonction de la longueur de séquence désirée (respectivement, en moyenne : 400-500 pb, 600-700 pb, 800-100 pb).

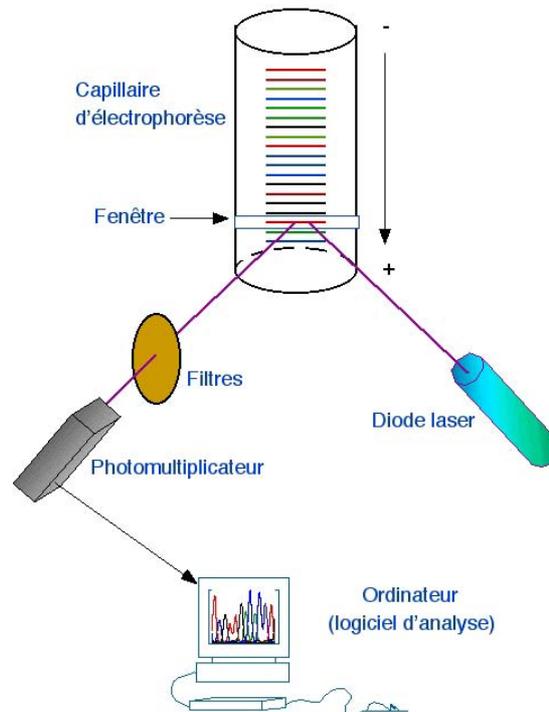


Figure 10 : Schéma du fonctionnement d'un séquenceur automatique.

3.7 Analyse phylogénétique

L'accumulation progressive de mutations au sein des génomes constitue une information cruciale sur l'histoire des espèces. Ainsi, les génomes ont été comparés à des "horloges moléculaires" (Zuckerland & Pauling 1965) : chaque région du génome accumule des mutations à un rythme qui lui est propre et qui est dicté par l'intensité de la pression de sélection à laquelle elle est soumise. Cette notion est liée à la théorie neutraliste de l'évolution selon laquelle la majeure partie des mutations fixées étaient sélectivement neutres ou presque neutres (Kimura 1968).

On définit par homologues des caractères dérivant d'un ancêtre commun. Le taux d'accumulation des mutations est du même ordre de grandeur dans des régions homologues (soumises à une même pression de sélection). Des régions homologues peuvent être comparées entre elles pour reconstruire une phylogénie des espèces. En outre pour être comparables, les gènes doivent avoir conservés une fonction identique. Les séquences d'ARN ribosomiaux 16S se sont rapidement imposées comme marqueurs de l'histoire évolutive car leur présence est universelle, leur fonction conservée, la pression qui s'exerce

sur elles est peu dépendante des conditions environnementales et elles possèdent une alternance de domaines conservés à hypervariables.

L'analyse phylogénétique consiste à évaluer les divergences entre plusieurs séquences : plus le nombre des substitutions entre deux séquences est élevé, plus la probabilité que ces deux séquences aient un ancêtre commun est faible. L'arbre phylogénétique est une représentation des résultats obtenus.

Les séquences ont été comparées avec celles disponibles dans les banques de données en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990) pour déterminer l'affiliation phylogénétique et détecter d'éventuelles chimères.

3.7.1 L'alignement

L'alignement des séquences à comparer constitue une première étape décisive dans l'analyse phylogénétique. Les séquences sont comparées deux à deux à l'aide du programme Clustal W (Thompson *et al.* 1994) du "package GCG" (Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA) utilisé sous environnement UNIX qui fournit un fichier de séquences alignées et une matrice présentant les similarités de tous les couples possibles. Les groupes de séquences présentant plus de 97% de similarité sont généralement représentés par une séquence type du phylotype correspondant à un ADNr 16S entièrement séquencé et utilisé pour la suite de l'analyse phylogénétique. Les séquences complètes sont obtenues par assemblages de séquences partielles obtenues grâce aux amorces internes (cf. Tableau 3) en utilisant le module SEQMAN du logiciel DNASTAR (Madison, WI, USA). Ces séquences types ont été alignées avec les séquences les plus proches issues des banques de données (clones environnementaux et /ou espèces décrites les plus proches).

Le programme Seaview (Galtier 1996) permet d'affiner les alignements "manuellement". Les positions réellement informatives varient selon les groupes taxonomiques étudiés. L'alignement de séquences signatures d'un groupe phylogénétique peut par exemple être vérifié. Dans une analyse de séquences correspondant à plusieurs genres, voire plusieurs familles, les régions hypervariables pourront être masquées car elles ne seront pas informatives. Cependant, ces régions peuvent devenir informatives dans l'analyse de séquences proches, appartenant par exemple à un même genre. Il convient donc de définir les régions à analyser avant d'utiliser les programmes de phylogénie.

3.7.2 Méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques

Après avoir aligné les séquences, les arbres phylogénétiques ont été construits avec le programme PHYLO_WIN (Galtier 1996). Ce programme permet d'utiliser des méthodes mathématiques modélisant différentes hypothèses quant à l'évolution des gènes, et génère des arbres phylogénétiques représentant les relations entre organismes. Les topologies d'arbres obtenues par les différentes méthodes doivent être cohérentes et conduire à un arbre consensus. Les trois méthodes utilisées pour la construction d'arbres sont :

➤ la méthode du "**Neighbor joining**" (Saitou & Nei 1987) : elle est la plus couramment utilisée en microbiologie. C'est une méthode de distance : elle est basée sur le nombre moyen de substitutions nucléotidiques entre des séquences prises deux à deux. Elle permet de trouver les paires de séquences "voisines" qui minimisent la somme des longueurs des branches à chaque étape de regroupement. C'est une méthode relativement rapide, qui génère un arbre selon l'évolution minimale et donne de bons résultats pour des séquences proches. Cependant elle n'est pas utilisable pour des séquences très éloignées, et elle traite toutes les substitutions de manière équivalente ce qui induit une perte d'informations. Comme dans toutes les méthodes de distance (ex : UPGMA), la méthode du "Neighbor joining" sous-estime le nombre d'évènements mutationnels car les substitutions sont simplement dénombrées et ne sont pas pondérées. Or des phénomènes de mutations multiples peuvent se produire. Différentes corrections ont été proposées pour tenter de corriger ce biais en faisant des hypothèses sur la façon dont les bases se sont substituées à un locus donné :

- la correction de Jukes et Cantor (Jukes & Cantor 1969) suppose que toutes les substitutions ont une probabilité égale : les transitions purine ↔ purine (A ↔ G), pyrimidine ↔ pyrimidine (C ↔ T) ; et les transversions purine ↔ pyrimidine ont le même poids. Cette correction suppose aussi qu'il n'y a eu ni insertions, ni délétions. Elle donne des résultats satisfaisants avec des séquences proches.

- la correction de Kimura (Kimura 1980) repose sur l'hypothèse que les transitions se produisent à des taux plus élevés que les transversions : le poids des transversions est double par rapport à celui des transitions.

➤ la méthode du **maximum de parcimonie** (Fitch 1971) : cette méthode recherche parmi tous les arbres possibles celui qui correspond à une évolution minimale. Les regroupements sont ceux qui minimisent le nombre de mutations nécessaires pour expliquer les différences entre les séquences. Contrairement aux méthodes de distances qui réduisent le nombre de substitutions pour des séquences complètes, chaque site nucléotidique est considéré individuellement. Cette méthode implique que les sites évoluent indépendamment les uns des autres. De plus, les sites présentant des nucléotides identiques sont considérés comme

"non-informatifs" et ne sont pas pris en compte dans le calcul ce qui réduit l'information. La durée de l'analyse croît de façon exponentielle avec le nombre de séquences, et n'est donc pas utilisable pour un grand nombre de séquences.

➔ la méthode du **maximum de vraisemblance** ("maximum likelihood") (Felsenstein 1981) : c'est une méthode statistique où les changements évolutifs dans la séquence nucléique suivent des modèles probabilistes. La probabilité de la substitution est calculée pour chaque position et pour chaque arbre. Cette méthode pondère de manière différente les événements de transitions et de transversions. L'arbre retenu sera celui dont les valeurs de longueurs de branches (estimées pour chaque position et chaque arbre sous un modèle évolutif donné) maximise sa vraisemblance. Cette méthode ne suppose pas que l'évolution ait été parcimonieuse. C'est une méthode robuste qui permet de comparer des séquences très éloignées, mais nécessite un temps de calcul très long pour l'analyse d'un grand nombre de séquences.

Chaque méthode d'analyse phylogénétique comporte des avantages et des inconvénients, mais aucune n'intègre tous les aspects des mécanismes biologiques de l'évolution des séquences. Aucune de ces méthodes n'est donc susceptible de fournir un arbre phylogénétique "vrai". Les différentes méthodes peuvent fournir des topologies différentes, et on estime que seules les branches retrouvées par les 3 méthodes sont susceptibles d'être une bonne image de la réalité. Par ailleurs, la robustesse des arbres a été testée par la méthode du bootstrap (Felsenstein 1985). Cette méthode d'analyse par échantillonnage permet d'évaluer la robustesse de chaque embranchement en donnant une mesure statistique de la confiance qui peut lui être attribuée. L'échantillonnage consiste à redistribuer les sites de façon aléatoire et à créer les topologies d'arbres correspondantes. L'opération est réalisée 100 à 1000 fois. La valeur de bootstrap d'un embranchement correspond à sa fréquence d'obtention sur les différentes topologies obtenues. Le groupe extérieur choisi ("outgroup") influence considérablement la topologie de l'arbre obtenu. L'"outgroup" doit être suffisamment distant des séquences étudiées pour permettre une bonne discrimination et un bon positionnement relatif, mais un "outgroup" trop éloigné risque de conduire à une topologie d'arbre "écrasée" (biais lié au phénomène d'attraction des longues branches (Philippe 2000)).

3.8 Hybridation sur cellules totales (Whole cell hybridization)

Ces expériences ont été menées par Françoise Lesongeur (Ifremer).

Les hybridations ont été réalisées sur lame Teflon ou sur filtre. Les sondes oligonucléotidiques (Eurogentec) ont été utilisées seules (simple hybridation) ou ensemble (double hybridation) : la sonde ARCH915 (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') marquée à l'indocarbocyanine (Cy3) est spécifique des archées, la sonde EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') marquée avec la fluorescéine-isothiocyanate (FITC) est spécifique des *Bacteria*.

➤ Hybridation sur filtre

Après fixation (voir 2.4.1), les cellules stockées dans un tampon PBS/éthanol 50% (v/v) ont été diluées si nécessaire et filtrées sur un filtre blanc en polycarbonate d'une porosité de 0,2 µm (Isopore Membrane Filter, Millipore) déposé sur une membrane de nitrocellulose. Après séchage à température ambiante, les cellules ont été hybridées avec les sondes ARCH915 et/ou EUB338.

L'hybridation a été effectuée pendant 2 h à 46°C, après addition sur chaque filtre de 1,5 µL de la sonde ARCH915 et/ou 1,5 µL de la sonde EUB338, chacune à une concentration de 50 ng. µL⁻¹ dans 12 µL de solution d'hybridation. Les filtres ont été rincés 15 min à 48°C dans une solution de lavage appropriée (Tableau 6).

Tableau 6 : Composition des solutions d'hybridation et de lavage.

Solutions	hybridation			lavage		
	ARCH915	EUB338	ARCH915 + EUB338	ARCH915	EUB338	ARCH915 + EUB338
NaCl 5M	360 µL	360 µL	360 µL	700 µL	4,5 mL	1,8 mL
Tris HCl 1M	40 µL	40 µL	200 µL	1 mL	1 mL	5 mL
EDTA 0,5M pH8	-	-	-	500 µL	-	-
Formamide	700 µL	200 µL	400 µL	-	-	-
SDS 10%	2 µL	2 µL	1 µL	50 µL	50 µL	25 µL
Eau MilliQ	898 µL (qsp 2 mL)	1398 µL (qsp 2 mL)	1039 µL (qsp 2 mL)	47,75 mL (qsp 50 mL)	44,45 mL (qsp 50 mL)	43,2 mL (qsp 50 mL)

Après l'hybridation, une "contre-coloration" des cellules a été réalisée par ajout de 10 µL de DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) à 1 µg. mL⁻¹ sur chaque filtre, puis rincés à l'eau distillée et à l'alcool 80%. Les filtres ont ensuite été recouverts de Citifluor (Citifluor, UK). L'observation en épifluorescence s'effectue grâce au microscope Olympus BX60 équipé d'une lampe UV et de filtres pour le DAPI (excitation 365 nm, émission 397 nm), le FITC (excitation 492 nm, émission 520 nm) et le Cy3 (excitation 550 nm, émission 570 nm).

➤ **Hybridation sur lame**

Les cellules fixées, stockées dans un tampon PBS/éthanol 50% (v/v), ont été diluées si nécessaire et avant dépôt de 10 μ L par puits sur une lame Teflon. Après séchage dans une étuve à 45°C pendant 30 min environ, les lames ont été immergées successivement dans des bains d'alcool aux concentrations croissantes : 50%, 80% et 100% (3 min / bain).

Les procédures d'hybridation, de lavage, de marquage au DAPI et d'observation ont été les mêmes que pour le traitement des filtres.

4 Description d'une nouvelle espèce de microorganisme

Les principaux critères étudiés lors de la caractérisation d'une nouvelle espèce microbienne sont présentés ci-dessous (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractères phénotypiques et génotypiques déterminés lors de la caractérisation d'une souche microbienne (liste non-exhaustive).

Critères phénotypiques
Morphologie : <ul style="list-style-type: none"> - forme de la cellule - taille de la cellule - mobilité - flagelle - type de division cellulaire - coloration de Gram
Physiologie :
Conditions de croissance (optimales et extrêmes) : <ul style="list-style-type: none"> - température - pH - salinité
Métabolisme : <ul style="list-style-type: none"> - test de croissance en autotrophie - substrats carbonés et substrats azotés - accepteurs d'électrons - effet de la phase gazeuse - produits du métabolisme
Critères génotypiques
<ul style="list-style-type: none"> - détermination du contenu en bases G et C de l'ADN génomique - positionnement phylogénétique : alignement de séquences d'ADNr 16S - hybridation ADN/ADN

4.1 Isolement, conditions et suivi de culture

A partir de la culture d'enrichissement à 60°C, un échantillon prélevé à T7 a servi d'inoculum pour trois séries de dilutions successives sur le milieu F1 à 60°C. Le séquençage de l'ADNr 16S d'une souche "isolée" a indiqué la présence d'une nouvelle espèce bactérienne au sein du genre *Marinitoga* appartenant à l'ordre des *Thermotogales* (la séquence présentait moins de 97% de similarité avec les deux espèces du genre déjà décrites). Une combinaison d'isolements en milieu liquide et d'isolements sur boîte ont été réalisés avant caractérisation de la souche obtenue, notée AT1271^T, en tant que nouvelle espèce (voir paragraphe 2.5).

La croissance de la souche a été testée sur différents milieux de culture couramment utilisés au laboratoire pour la culture des *Thermotogales*. Les milieux ont été testés en présence et en absence de soufre et de thiosulfate. Le milieu GYPS (Tableau 8) a finalement été choisi pour l'étude de caractérisation et les cultures ont été réalisées à 60°C (température d'enrichissement et d'isolement).

Tableau 8 : Composition du milieu GYPS-pH6.

Composants	Concentrations
glucose	5 g. L ⁻¹
extrait de levure	0,5 g. L ⁻¹
peptone	1 g. L ⁻¹
Sea Salts	30 g. L ⁻¹
tampon MES	3,9 g. L ⁻¹

La croissance de la souche a été estimée par comptage en cellule de Thoma, ou par mesure de la densité optique. Dans ce cas, la concentration cellulaire a été déterminée indirectement par la turbidité du milieu due à la croissance cellulaire. L'absorbance à 600 nm a été mesurée grâce à un spectrophotomètre (Spectronic 401, Milton Roy). Les cultures en tubes de Hungate sur milieu GYPS sans soufre permettent une lecture directe de l'absorbance par insertion des tubes dans le spectrophotomètre, après homogénéisation. La proportionnalité entre l'absorbance à 600 nm et la concentration cellulaire n'est valable que pour une gamme de concentrations cellulaires à définir. Une corrélation a été établie entre l'absorbance à 600 nm et le dénombrement cellulaire par comptage en cellule de Thoma. Bien que la technique de comptage en cellule de Thoma puisse être utilisée en théorie sur une gamme plus large de concentrations cellulaires (à partir de 10⁶ cellules. mL⁻¹, sans limite supérieure), la technique de lecture de l'absorbance sera préférée lorsque de nombreuses mesures de concentration cellulaire sont nécessaires à l'expérimentation.

4.2 Caractérisation morphologique de l'isolat

4.2.1 Microscopie optique

La morphologie, le mode de division et la mobilité des cellules ont été déterminés par des observations au microscope à contraste de phase Olympus BX60, aux grossissements X400 et X1000. L'observation des cellules dans des milieux contenant des substrats complexes (e.g. polysaccharides), du soufre ou des précipités minéraux est facilitée par un marquage spécifique des cellules au DAPI et une observation en épifluorescence (voir 2.4.2).

4.2.2 Détermination du Gram

Les cellules fixées sont colorées au cristal violet et à l'iode, puis traitées à l'alcool. Les cellules à Gram positif (peptidoglycane très épais) conservent une couleur violette après ce traitement. Les cellules à Gram négatif (peptidoglycane fin, espace périplasmique et membrane externe) sont décolorées par l'alcool et apparaissent roses après une contre-

coloration à la safranine. La coloration de Gram a été réalisée en utilisant le kit "Bacto-3-step Gram stain Set-S" (Difco).

La réaction au RuyKOH a également été réalisée (Powers 1995). Il s'agit d'une méthode simple et rapide ne nécessitant pas de coloration. L'apparition d'une viscosité dans une suspension cellulaire contenant 3% d'hydroxyde de potassium (KOH) indique que le microorganisme étudié est Gram négatif. La viscosité est due à une lyse des cellules, confirmée par microscopie en contraste de phase. Le mélange "culture + KOH" a été réalisé sur lame. L'interprétation du résultat est relativement simple et permet de confirmer le résultat de la coloration de Gram.

4.2.3 Microscopie électronique à transmission

Ces expériences ont été réalisées avec l'aide de Mélusine Gaillard et Gérard Sinquin (Université de Bretagne Occidentale, Brest).

Cette technique a été employée pour la recherche de flagelles sur des cellules colorées négativement. Les cellules (5 μL de culture) sont déposées sur une grille de carbone. Après séchage 2 min à l'air, l'excédent liquide est absorbé sur papier Whatman. Puis 5 μL d'une solution d'acétate d'uranyle à 2 % sont déposés sur la grille. Cette opération est effectuée à l'obscurité. Après 40 secondes, l'excédent liquide est absorbé comme précédemment, suivi d'un séchage à l'air quelques heures. L'observation des grilles a été réalisée sur un microscope à transmission Modèle EM 201 (Philips).

4.3 Détermination des conditions de croissance

La détermination des conditions de croissance consiste à étudier l'influence des trois paramètres suivants sur la croissance : température, pH et salinité. La procédure employée est la suivante : un des trois paramètres varie alors que les deux autres sont maintenus constants.

Pour chacun des paramètres, la gamme pour laquelle une croissance est observée a d'abord été déterminée : deux cultures ont été réalisées en parallèle pour chaque condition et suivies par mesure de l'absorbance à 600 nm toutes les heures. La concentration cellulaire initiale était comprise entre $5 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^7$ cellules. mL^{-1} . Pour chaque condition, un milieu non-inoculé a servi de témoin pour la mesure de l'absorbance.

Une seconde série de cultures a permis de déterminer les conditions optimales de croissance. Trois cultures ont été réalisées en parallèle pour chaque condition et suivies par mesure de l'absorbance à 600 nm toutes les 30 min. Les cinétiques ainsi obtenues ont permis de calculer les taux de croissance maximum μ_{max} pour chaque condition testée. Le taux de croissance μ_{max} , exprimé en h^{-1} , correspond à la vitesse de croissance de la souche pendant la phase exponentielle. Il est donné par la pente de la droite : **Ln (absorbance 600**

$\ln 2 / \mu_{\max}$). Le temps de génération **G** est égal à $\ln 2 / \mu_{\max}$. Pour chaque condition, les trois répétitions de culture ont permis le tracé de trois courbes de croissance et le calcul de μ_{\max} pour chacune. Le μ_{\max} moyen correspondant assorti d'un intervalle de confiance a été reporté sur un graphique représentant les différents μ_{\max} moyens en fonction de la valeur du paramètre étudié. La courbe permet de déterminer visuellement la valeur du paramètre (parmi celles testées) pour laquelle la croissance de la souche étudiée est maximale. Un exemple de calcul est présenté en annexe 3.

4.3.1 Température

Pour déterminer l'effet de la température, des milieux GYPS pH 6 ont été préparés en tube. Dans un premier temps, deux cultures en tube sont réalisées sur milieu GYPS-pH 6 pour les températures : 22°C, 30°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C et 90°C (mesure de l'absorbance toutes les heures). La détermination de l'optimum a été obtenue par réalisation de trois cultures en tube sur milieu GYPS-pH 6 pour les températures : 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C et 75°C (mesure de l'absorbance toutes les 30 min).

4.3.2 pH

Pour l'étude de l'influence du pH, des milieux GYPS à différents pH ont été préparés. Les cultures ont été réalisées à 60°C. Pour déterminer les "bornes", deux tubes ont été inoculés pour chacun des pH suivants : 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10. Pour déterminer les optima, trois tubes ont été inoculés pour les pH : 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 et 8,5. La préparation des milieux a nécessité l'utilisation de différents tampons :

- MES à 3,9 g. L⁻¹ pour les milieux de pH 5,5 à 6,5 ;
- PIPES pour les milieux à pH 7 ;
- HEPES pour les milieux de pH 7,5 à 8 ;
- AMPSO pour les milieux de pH 8,5 à 10.

4.3.3 Salinité

Des milieux GYPS à pH 6 de différentes salinités ont été préparés. Les concentrations en Sea Salts testées dans un premier temps sont : 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 g. L⁻¹, puis de 5 à 75 g. L⁻¹ (par incrément de 5 g. L⁻¹) pour la détermination de la salinité optimale. Ces cultures ont été réalisées à 60°C.

NB : 30 g. L⁻¹ de Sea Salts correspondent à 21,9 g. L⁻¹ de NaCl.

4.4 Caractérisation métabolique

Différents milieux ont été réalisés pour tester l'utilisation d'accepteurs d'électrons, de sources de carbone et/ou d'énergie et de sources d'azote, et pour tester la croissance en autotrophie et l'effet de différentes phases gazeuses. Des témoins non-inoculés ont été réalisés pour chaque condition testée. La croissance a été suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm et dans certains cas par comptage cellulaire. Des analyses par HPLC et chromatographie en phase gazeuse ont également été effectuées, soit pour confirmer la consommation de certains substrats, soit pour identifier des produits du métabolisme. Le milieu de base utilisé est le suivant :

- Sea salt 30 g. L⁻¹,
 - MES 3,9 g. L⁻¹,
 - extrait de levure 0,1 g. L⁻¹,
 - vitamines de Balch* 10 mL. L⁻¹
 - minéraux traces de Balch* 10 mL. L⁻¹
 - ajustement pH 6
- *(Balch *et al.* 1979).

4.4.1 Accepteurs d'électrons

Au milieu de base sont ajoutés les accepteurs d'électrons suivants :

- thiosulfate 20 mM,
- sulfate 20 mM,
- sulfite 1 mM,
- nitrate 20 mM,
- nitrite 1 mM,
- cystine 50 mM
- soufre 10 g. L⁻¹.

L'absorbance à 600 nm et des comptages cellulaires ont été effectués après 8 h d'incubation, et comparés à une croissance sur un milieu sans accepteur d'électrons ajouté. La production de sulfure d'hydrogène (H₂S) a été recherchée : elle résulte de la capacité de la souche à réduire des composés soufrés. Pour cela, une goutte de la culture a été déposée sur une bande d'acétate de plomb (Whatman) : l'apparition d'un brunissement témoigne de la présence de H₂S par rapport à la coloration obtenue avec un témoin non-inoculé, incubé dans les mêmes conditions.

4.4.2 Sources de carbone et/ou d'énergie

Les sources de carbone ajoutées sont présentées ci-dessous. Il s'agit de sucres (monosaccharides, disaccharides, polysaccharides), d'acides organiques, d'alcool, de sources de peptides et d'acides aminés et de substrats complexes.

➤ cellobiose	5 g. L ⁻¹	➤ acétate	2 g. L ⁻¹
glucose	5 g. L ⁻¹	pyruvate	2 g. L ⁻¹
maltose	5 g. L ⁻¹	➤ éthanol	5 mL. L ⁻¹
fructose	5 g. L ⁻¹	➤ extrait de levure	2 g. L ⁻¹
galactose	5 g. L ⁻¹	bouillon cœur-cervelle	2 g. L ⁻¹
ribose	5 g. L ⁻¹	peptone	2 g. L ⁻¹
amidon	5 g. L ⁻¹	tryptone	2 g. L ⁻¹
cellulose	5 g. L ⁻¹	caséine	2 g. L ⁻¹
glycogène	5 g. L ⁻¹	Casaminoacide	2 g. L ⁻¹
chitine	5 g. L ⁻¹	kératine	2 g. L ⁻¹
pectine	5 g. L ⁻¹	➤ solution de 20 acides aminés	
carboxyméthylcellulose	5 g. L ⁻¹	chacun à 0,1 g. L ⁻¹	

L'extrait de levure à 0,1 g. L⁻¹ a été conservé dans le milieu de base uniquement pour le test de la consommation des sucres, des acides organiques et de l'alcool. Dans une seconde série de cultures, cette concentration en extrait de levure a été augmentée à 1 g. L⁻¹. Les cultures ont été réalisées à 60°C. Une estimation de la croissance a été effectuée après 8 h et 24 h d'incubation, par mesure de l'absorbance et/ou comptage cellulaire. Des analyses par HPLC ont permis de confirmer la consommation de certains substrats. Les cultures "positives" ont été repiquées par dilution au 20^{ème} sur le même milieu pour confirmer la croissance.

4.4.3 Sources d'azote

Le milieu de base utilisé était exempt d'extrait de levure et contenait du glucose (5 g. L⁻¹). Les sources d'azote testées sont :

- l'extrait de levure 0,2 g. L⁻¹,
- l'urée 0,2 g. L⁻¹,
- le NH₄Cl 1 g. L⁻¹.

Les cultures ont été réalisées à 60°C. La croissance cellulaire a été estimée après 8 h et 24 h d'incubation. Les cultures "positives" ont été repiquées au 20^{ème} sur le même milieu pour confirmer la croissance.

4.4.4 Test de la croissance en autotrophie

Les milieux ont été préparés sans aucune source carbonée. Le milieu de base exempt d'extrait de levure a été complété, soit en NH₄Cl (1 g. L⁻¹), soit en extrait de levure (0,1 g. L⁻¹) comme source d'azote. Les cultures ont été incubées à 60°C avec une phase gazeuse H₂/CO₂ (80/20) (voir 4.4.6). Une estimation de la croissance a été effectuée

après 8 h et 24 h d'incubation. Les cultures "positives" ont été repiquées comme précédemment.

4.4.5 Analyse des produits du métabolisme

Ces expériences ont été réalisées par Patricia Pignet (Ifremer, Brest) et Marie-Laure Fardeau (IRD, Marseille).

Les analyses ont été réalisées par HPLC et chromatographie phase gazeuse (voir 2.4.3).

4.4.6 Influence de la phase gazeuse

Les mélanges gazeux ont été réalisés grâce à un équipement de la société Air Liquide. La phase gazeuse initiale des milieux de culture (N₂/H₂/CO₂; 90/5/5) a été remplacée par réalisation d'environ 10 cycles : *vide* ⇔ *addition du mélange gazeux calibré*.

➔ Les phases gazeuses ci-dessous ont été testées sur des cultures sur milieu GYPS, en présence et en absence de soufre :

- N₂/H₂/CO₂ 90 : 5 : 5
- H₂/CO₂ 80 : 20
- N₂/CO₂ 80 : 20
- N₂ 100

Les cultures ont été réalisées à 60°C et suivies après 8 h et après 24 h d'incubation.

➔ La tolérance à l'hydrogène a été testée lors d'une première série de cultures où le pourcentage d'hydrogène variait comme indiqué (voir ①).

- ① H₂/N₂ 100 : 0
- H₂/N₂ 90 : 10
- H₂/N₂ 75 : 25
- H₂/N₂ 50 : 50
- H₂/N₂ 25 : 75
- H₂/N₂ 10 : 90

Dans une seconde série de cultures (voir ②), la souche AT1271^T ainsi que les deux espèces les plus proches, *Marinitoga camini* et *Marinitoga piezophila*, ont été cultivées avec trois répétitions sur milieu GYPS à 60°C, 50°C et 65°C respectivement. Les densités cellulaires ont été estimées par comptages après 4 h, 8 h, 12 h, et 24 h d'incubation.

- ② H₂/N₂ 100 : 0
- H₂/N₂ 80 : 20
- H₂/N₂ 60 : 40
- H₂/N₂ 40 : 60
- H₂/N₂ 20 : 80
- H₂/N₂ 0 : 100

➔ La tolérance à l'oxygène a été testée par réalisation des cultures sur un milieu GYPS en présence des concentrations suivantes d'oxygène dans la phase gazeuse: 0, 1, 2, 3, 4 et 5%. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque concentration. La croissance a été détectée par observation microscopique.

Ces expériences ont été réalisées par Marie-Laure Fardeau (IRD, Marseille)

4.5 Caractérisation génétique de l'isolat

4.5.1 Détermination du G+C mol%

Ces expériences ont été réalisées par Françoise Lesongeur (Ifremer).

Pour déterminer le pourcentage de bases guanine et cytosine contenu dans le génome de la souche AT1271^T, l'ADN total est soumis à un chauffage progressif jusqu'à fusion de l'ADN : les double brins se séparent. Les molécules d'ADN bicaténares ont une absorbance plus faible à 600 nm que les molécules monocaténares. La mesure de l'augmentation d'absorbance ou cours du chauffage permet de déterminer le T_m (melting temperature ou température de fusion) qui correspond à la température au point d'inflexion de la courbe : $absorbance = f(température)$. La guanine et la cytosine s'apparient par 3 liaisons hydrogène alors que l'adénine et la thymine ne s'apparient que par 2 liaisons hydrogène. La fusion de l'ADN bicaténaire s'effectuera à une température qui sera d'autant plus élevée que le nombre de liaisons hydrogène est élevé. La relation qui lie le T_m et la teneur en G+C est linéaire et déterminée pour des conditions expérimentales données, grâce à 3 ADN de référence (Sigma) choisis pour couvrir une large gamme de G+C% : *Clostridium perfringens* (36,5 G+C mol %), *Escherichia coli* souche B (50 G+C mol %) et *Micrococcus luteus* (72 G+C mol %). Le T_m de la souche décrite est déterminé dans les mêmes conditions expérimentales, puis le G+C mol % est déduit d'une relation linéaire de type $T_m = a(G+C \text{ mol } \%) + b$ établie à l'aide des ADN de référence.

Ces expériences ont été réalisées avec un spectrophotomètre Uvikon 940 (Kontron) couplé à un bain-marie Ministat (Huber). Les ADN sont testés à une concentration de 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans un tampon TE 1X.

4.5.2 Analyse phylogénétique de l'ADNr 16S

Le positionnement phylogénétique de la séquence d'ADNr 16S d'un isolat a été réalisé par alignement de cette séquence avec celles des souches décrites les plus proches, entre autres, suivi de la construction d'un arbre phylogénétique, comme décrit au paragraphe 3.7.

Chapitre 1

Diversité microbienne d'une cheminée hydrothermale du site Rainbow (36°14'N), Dorsale Médio-Atlantique

Article en préparation :

Cambon-Bonavita, M.-A., Postec, A., Jean, J., Nadalig, T., Cambon, P., Etoubleau, J., Godfroy, A., Fouquet, Y. & Querellou, J. Microbial diversity from black smoker samples collected in Rainbow deep-sea hydrothermal vent field, Mid-Atlantic Ridge: ecological implications. En préparation.

L'analyse de la diversité des ARNr 16S a été largement employée pour compléter les descriptions basées sur les cultures des communautés microbiennes des sources hydrothermales océaniques. Sur le site de Rainbow, les fluides présentent des températures extrêmement élevées (365°C), un pH particulièrement bas (2,8) ; et des concentrations élevées en H₂, CH₄, CO₂ et métaux (en particulier le fer) ont été mesurées (Charlou *et al.* 2002). Une analyse géochimique des différentes parties de la cheminée échantillonnée et étudiée dans ce travail (cf. Matériel et Méthode 1.) indique une forte quantité de sulfures de zinc dans la partie externe de la cheminée (AT2E1) ; alors que les sulfures de fer sont dominants dans les parties internes, qu'elles soient friables ou massives (Cambon-Bonavita *et al.*, en préparation). L'échantillon de cheminée AT2E1-8, qui correspond au mélange de 8 sous-échantillons de la cheminée hydrothermale AT2E prélevée sur le site Rainbow, a servi d'inoculum pour les cultures d'enrichissement menées pendant cette thèse (Chapitres 2 et 3). Cet échantillon a fait l'objet d'une analyse de la diversité microbienne par observation microscopique (diversité morphologique) et par utilisation de techniques moléculaires (DGGE et clonage) basées sur l'analyse des gènes codant pour les ARNr 16S archéens et bactériens. Ces résultats sont développés ci-après. Par ailleurs, une seconde cheminée, notée 'PICO', a été échantillonnée dans la même zone du site Rainbow (campagne PICO, 1998). Une analyse de la diversité microbienne a également été pratiquée sur cette cheminée, par analyse des séquences d'ADNr 16S archéennes et bactériennes clonées. Ces derniers résultats compilés avec ceux relatifs à la cheminée AT2E sont représentés sur des arbres phylogénétiques présentés à la fin de ce chapitre. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un article actuellement en préparation.

1 Diversité morphologique

Une extraction des cellules a été réalisée à partir de l'échantillon de cheminée AT2E1-8 selon le protocole décrit par Harmsen *et al.* (Harmsen *et al.* 1997b). Un marquage au DAPI et une observation en épifluorescence de ces cellules a permis de mettre en évidence une importante diversité morphologique : coques de taille variable, diplocoques, bâtonnets de longueur variable, droits ou incurvés, chaînettes de bacilles etc. (Figure 1). Le marquage des cellules au moyen de sondes oligonucléotidiques spécifiques (FISH) des *Archaea* et des *Bacteria* n'a malheureusement pas pu être réalisé, par manque d'échantillons conditionnés pour ce type d'étude.

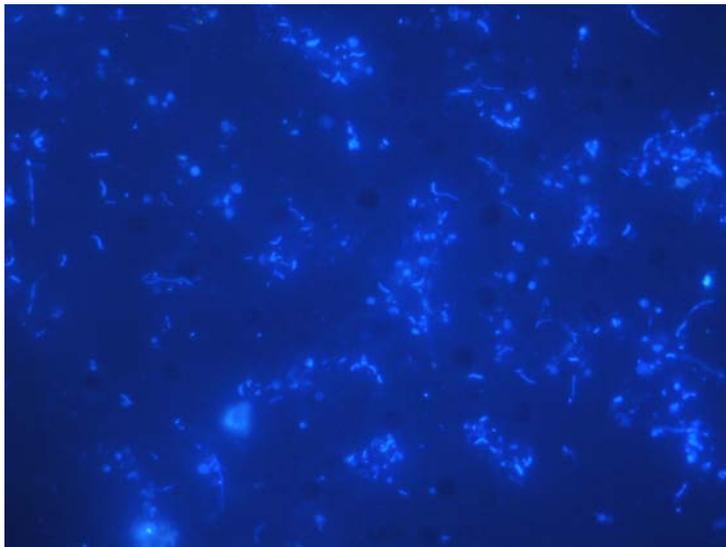


Figure 1 : Cellules totales extraites de l'échantillon de cheminée et observées en épifluorescence (X1000) après marquage au DAPI.

2 Extraction des acides nucléiques totaux et amplification des ADNr 16S

A partir de 15 mL de suspension aqueuse de l'échantillon de cheminée AT2E1-8 et après agitation vigoureuse, les acides nucléiques totaux ont été extraits avec succès. Les ADNr 16S ont ensuite été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques des domaines *Archaea* et *Bacteria* qui permettent d'amplifier des fragments de 1900 et 1500 pb respectivement. Pour la DGGE, les amorces utilisées contiennent un GC-clamp de 40 nucléotides en 5'. Elles permettent l'amplification de fragments de 560 pb environ, fragments qui correspondent à la région hypervariable V3 des ADNr 16S archéens et bactériens. Les ADNr 16S obtenus par amplification ont été séparés par DGGE et par clonage. La DGGE permet une séparation directe des fragments alors que le clonage est une méthode indirecte. Le séquençage des fragments obtenus par les deux méthodes permet d'accéder à la diversité des séquences, et ainsi d'obtenir une image de la diversité des microorganismes présents dans la cheminée AT2E1-8.

3 Diversité microbienne par DGGE

L'utilisation de cette technique a été adaptée au cours de cette thèse pour analyser le suivi des populations microbiennes cultivées en bioréacteur. Cette technique a également été utilisée pour l'analyse de l'échantillon de cheminée AT2E1-8.

Dans l'analyse des ADNr 16S archéens, 2 bandes ont été obtenues sur gel, et les fragments correspondant aux ont pu être extraits, ré-amplifiés et directement séquencés. Leur affiliation phylogénétique a été déterminée en utilisant le programme BLAST :

- la séquence 3.1-EBA présentait 93% d'identité avec '*Methanococcus aeolicus*' ,
 - la séquence 4.1-EBA présentait 96% d'identité avec *Methanothermococcus okinawensis*.
- Ces deux séquences sont affiliées à l'ordre des *Methanococcales*, ce qui suggère la dominance de ce groupe.

De la même façon, les ADNr 16S bactériens séparés par DGGE ont permis d'obtenir 3 bandes :

- la séquence 1-EBB présentait 93% d'identité avec *Caldithrix abyssi* (AJ430587) (Miroshnichenko *et al.* 2003a), une bactérie hydrothermale thermophile modérée, anaérobie, capable de réduire les nitrates et de pousser en mixotrophie. Cette souche a été isolée du site Logatchev (situé sur une roche ultramafique, de même que Rainbow) et représente une nouvelle lignée bactérienne ;
- les séquences 2-EBB et 3-EBB présentaient respectivement 97 et 98% d'identité avec *Desulfovibrio hydrothermalis* (AF458778), bactérie mésophile, hydrogénéotrophe, sulfato-réductrice isolée d'une source hydrothermale de la Ride Est-Pacifique (Alazard *et al.* 2003).

4 Diversité des clones archéens

Le séquençage partiel des fragments d'ADNr 16S clonés a permis d'obtenir des séquences d'une longueur d'environ 700 pb. Elles se répartissent en six phylotypes et sont affiliées aux trois ordres suivants : *Methanococcales*, *Thermococcales* et *Archaeoglobales* (Tableau 1).

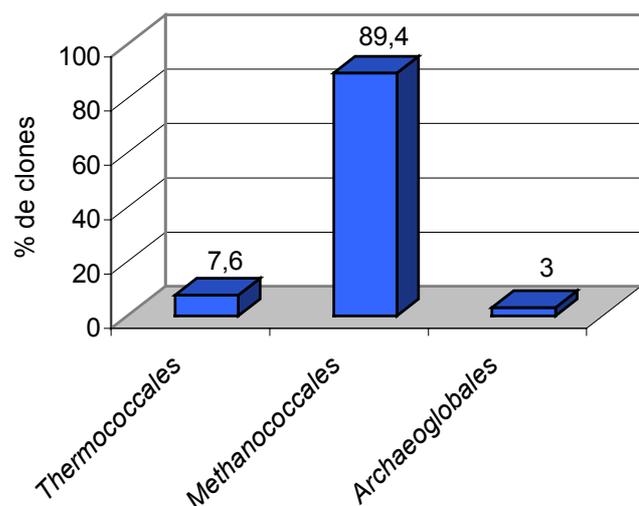


Figure 2 : Distribution des séquences d'ADNr 16S d'*Archaea* obtenues par clonage à partir de l'échantillon de cheminée.

Tableau 1 : Diversité archéenne de l'échantillon de cheminée : distribution et affiliation phylogénétique des 66 séquences d'ADNr 16S obtenues par clonage.

Affiliation phylogénétique	Séquence type	Nombre de clones ^a	Représentant le(s) plus proche(s)	Identité (%) ^b
<i>Methanococcales</i>	EBA8	49	Clone G26_C45, incultivé (AF356629) <i>Methanothermococcus okinawensis</i> (AB057722)	97 96
	EBA58	10	<i>Methanocaldococcus infernus</i> (AF025822)	97
<i>Thermococcales</i>	EBA100	2	<i>Thermococcus celer</i> (M21529)	98
	EBA63	2	<i>Thermococcus siculi</i> (AJ298870)	98
	EBA9	1	<i>Thermococcus barophilus</i> (AY099172)	98
<i>Archaeoglobales</i>	EBA4	2	Clone VC2.1arch8, incultivé (AF068819)	96
			<i>Archaeoglobus venificus</i> (Y10011)	92

^a > 98% de similarité entre les séquences d'un même groupe, sur 700 pb approximativement.

^b Résultats de BLAST.

L'analyse des séquences d'ADNr 16S de la banque de clones archéens a indiqué que l'ensemble des clones obtenus était étroitement apparenté à des organismes cultivés appartenant tous aux *Euryarchaeota* et isolés d'habitats hydrothermaux océaniques profonds, hormi les 2 séquences d'*Archaeoglobales* plus éloignées de la souche cultivée la plus proche (92% d'identité avec *A. venificus*). Parmi les 6 phylotypes identifiés, les deux phylotypes de l'ordre des *Methanococcales* regroupent près de 90% des clones (Figure 2). La séquence type EBA8 est proche de celle du clone G26_C45 issu d'une cheminée hydrothermale du Bassin de Guaymas (Longnecker et Reysenbach, non publié), et de la souche chimolithoautotrophe *Methanothermococcus okinawensis*, isolée d'une source hydrothermale de la fosse d'Okinawa, sud-ouest Pacifique (Takai *et al.* 2002). La séquence EBA58 présente quant à elle 97% d'identité avec celle de *Methanocaldococcus infernus*, isolée du site hydrothermal atlantique Logatchev (situé sur roche ultramafique) (Jeanthon *et al.* 1998). Tous les membres des genres *Methanocaldococcus* sont des méthanogènes hydrogénotrophes, chimolithoautotrophes stricts et hyperthermophiles endémiques des sources hydrothermales (Whitman 2001). La présence de methanoarchaea (Ollivier & de Macario 2004) peut s'expliquer par les taux particulièrement élevés dans les fluides de Rainbow d'hydrogène pouvant être utilisé comme donneur d'électrons, et de CO₂, source potentielle de carbone. Dans une étude récente (Nercessian *et al.* 2005), la présence de methanoarchaea appartenant au genre *Methanothermococcus* a également été montrée au sein de fragments de cheminée du site Rainbow par la détection du gène *mcrA*. Ce gène code pour la sous-unité α de la méthyl coenzyme M réductase (MCR), enzyme qui est impliquée dans la méthanogénèse.

Trois phylotypes ont été identifiés au sein de l'ordre des *Thermococcales*. Les séquences types de ces phylotypes, EBA100, EBA63 et EBA9, sont apparentées

respectivement à *Thermococcus celer*, *Thermococcus siculi* et *Thermococcus barophilus*. Ces 3 phylotypes regroupent 7,5% des clones de la banque archéenne. Les *Thermococcales* sont largement distribuées dans les environnements hydrothermaux océaniques, comme l'ont montré plusieurs études, et le genre *Thermococcus* en particulier contient de nombreux représentants cultivés et décrits (cf. Introduction bibliographique, Tableau 5). Des collecteurs ou incubateurs *in situ* déployés près de sources hydrothermales de la dorsale Médio-Atlantique ont permis la mise en évidence d'une large majorité de *Thermococcales* au sein des *Archaea* détectées (Corre *et al.* 2001, Nercessian *et al.* 2003, Reysenbach *et al.* 2000). Bien que quelques séquences étaient affiliées au genre *Pyrococcus* (Nercessian *et al.* 2003), la majorité des séquences correspondaient à des espèces cultivées du genre *Thermococcus*. Toutefois ce groupe n'est généralement pas détecté dans des analyses de la diversité associée aux fluides ou dépôts hydrothermaux (Huber *et al.* 2002, Takai & Horikoshi 1999).

Le troisième groupe archéen détecté dans notre étude correspond aux *Archaeoglobales*. La séquence type EBA4 représentant 3% des clones archéens était affiliée à la séquence environnementale VC2.1arch 8 provenant du site hydrothermal atlantique Snake Pit (Reysenbach *et al.* 2000). L'organisme cultivé le plus proche est *Archaeoglobus venificus* (92%) qui est une espèce chimiolithoautotrophe facultative capable de réduire le sulfite et le thiosulfate en sulfure (Huber *et al.* 1997).

Des séquences d'ARNr 16S relatives aux membres hyperthermophiles des ordres *Methanococcales*, *Thermococcales* et *Archaeoglobales* sont fréquemment obtenues dans les banques de clones environnementaux relatives aux sources hydrothermales marines profondes. Notre étude corrobore partiellement les résultats obtenus par Nercessian *et al.* (Nercessian 2004) puisqu'ils ont également détecté dans des fragments de cheminée de Rainbow des *Methanocaldococceae* (fort signal) ainsi que des *Thermococcales* et des *Archaeoglobus* grâce à l'utilisation de sondes oligonuléotidiques spécifiques de différents niveaux taxonomiques. Leur étude montrait aussi la présence de *Desulfurococcales* et de DHVE2 (Deep sea hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group I (Takai & Horikoshi 1999)) (faible signal) qui n'ont pas été détectées dans notre étude.

Des expériences de cultures d'enrichissement et d'isolement réalisées à partir d'échantillons de cheminées et de fluides hydrothermaux ont montré que les *Archaea* anaérobies hyperthermophiles se développaient dans les pôles chauds de l'écosystème (Harmsen *et al.* 1997b, Takai *et al.* 2001). L'examen de la distribution spatiale des populations microbiennes dans les cheminées par hybridation sur cellules totales a montré que les *Archaea* pouvaient représenter jusqu'à 50% de la communauté microbienne totale (Harmsen *et al.* 1997a). Notre étude ne met pas en évidence de séquences affiliées aux *Crenarchaeota* (*Desulfurococcus*, *Ignicoccus* etc.), aux *Korarchaeota* ou à des groupes

d'incultivés au sein des *Euryarchaeota* (DHVE), tous ces groupes ayant pourtant été détectés dans des échantillons hydrothermaux océaniques du Pacifique (Schrenk *et al.* 2004, Schrenk *et al.* 2003, Takai *et al.* 2001). Ceci pourrait suggérer une diversité archéenne moindre dans les sites hydrothermaux de l'Atlantique (Nercessian 2004, Schrenk *et al.* 2004).

5 Diversité des clones bactériens

Les ϵ -*Proteobacteria* et les δ -*Proteobacteria* sont les deux principaux groupes auxquels est affiliée la grande majorité des séquences de clones bactériens obtenus (Figure 3). Parmi les ϵ -*Proteobacteria*, les séquences obtenues sont relativement diversifiées (voir arbre Figure 5). D'après les résultats du BLAST, la majorité des phylotypes sont proches de séquences environnementales d'origine hydrothermale océanique profonde (le plus souvent atlantique). Elles peuvent être issues de la microflore de colonisateurs *in situ* ou de la microflore associée aux animaux (*Alvinella* sp., *Rimicaris* sp.). Notons toutefois que la présence d'*Alvinella* sp. n'a jamais été mise en évidence dans l'Atlantique. De façon intéressante, la séquence EBB25 présente 98% d'identité avec la séquence d'un microorganisme provenant du tube digestif d'une crevette *Rimicaris exoculata* récoltée sur ce même site Rainbow (Zbinden & Cambon-Bonavita 2003). Certaines séquences sont très proches de celles de souches décrites telles que *Sulfurimonas autotrophica* isolée de sédiments hydrothermaux du sud-ouest Pacifique (Inagaki *et al.* 2003). *S. autotrophica* est une bactérie mésophile capable de croissance en autotrophie par oxydation du soufre et du thiosulfate, en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons. Elle n'utilise pas l'hydrogène. Parmi les δ -*Proteobacteria*, la majorité des séquences est affiliée à des organismes sulfato-réducteurs, et entre autres à *Desulfovibrio hydrothermalis* : cet organisme est mésophile, anaérobie strict, hydrogénotrophe et capable de réduire le sulfate, le sulfite et le thiosulfate. La souche décrite a été isolée à partir d'une cheminée du Pacifique oriental (EPR 13°N) (Alazard *et al.* 2003). Le fluide étant dépourvu de sulfates, les accepteurs d'électrons utilisés par les microorganismes sulfato-réducteurs sont probablement fournis par l'eau de mer. Les *Cytophaga* et les *Verrucomicrobia* ont également été détectés et sont apparentés à des clones environnementaux obtenus à partir d'animaux des sources hydrothermales océaniques (gastéropodes, vers). Les séquences de γ -*Proteobacteria* obtenues sont proches de celles de microorganismes psychrophiles provenant de sédiments profonds de l'Atlantique (*Psychromonas profunda*), ou de glaces de l'Antarctique (*P. antarcticus*). La séquence type EBB110, représentant un groupe de 7 séquences, ne présente que 84% d'identité avec *Caldithrix abyssi*, le microorganisme cultivé le plus proche. *C. abyssi* est une

bactérie thermophile modéré, anaérobie et mixotrophe, qui a été isolée du site hydrothermal Logatchev de la dorsale médio-atlantique (Miroshnichenko *et al.* 2003a).

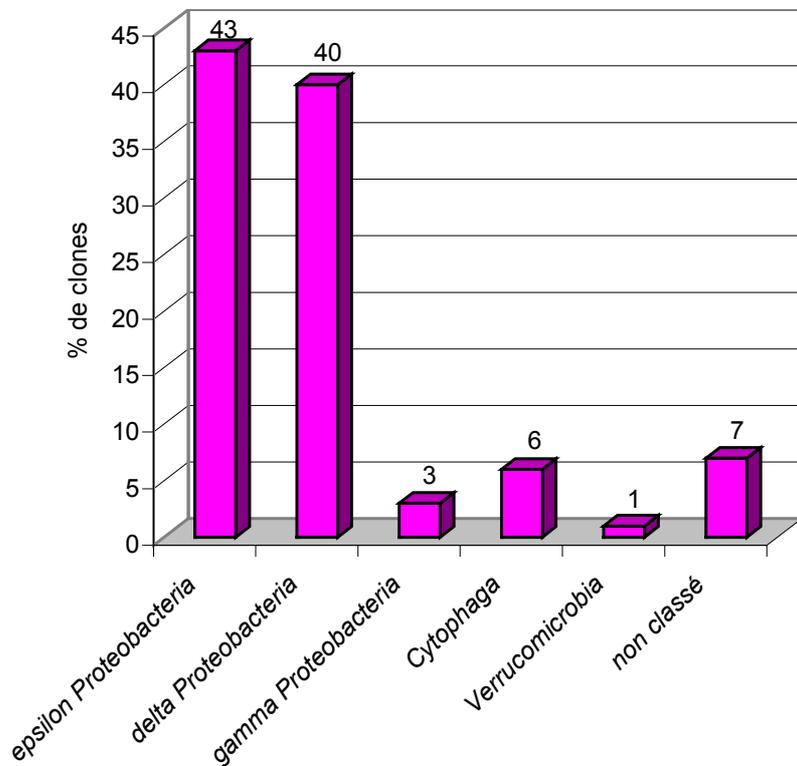


Figure 3 : Distribution des séquences d'ADNr 16S de *Bacteria* obtenues par clonage à partir de l'échantillon de cheminée.

Tableau 2 : Diversité bactérienne de l'échantillon de cheminée : distribution et affiliation phylogénétique des 96 séquences d'ADNr 16S obtenues par clonage. (SHOP = Source Hydrothermale Océanique Profonde, MAR = Mid Atlantic Ridge, EPR = East Pacific Rise)

Affiliation phylogénétique	Séquence type	Nombre de clones ^a	Représentant(s) le(s) plus proche(s)	Identité (%) ^b
ε Proteobacteria	EBB98	22	Clone AT-pp6 (AY225613), micro-colonisateur, Lucky Strike, MAR	98
			Clone VC2.1 Bac32 (AF068806), Vent-Cap, Snake Pit, MAR	97
	EBB62	1	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> (AB088431)	98
	EBB108	1	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> (AB088431)	97
	EBB45	1	Clone AT-pp6 (AY225613), micro-colonisateur, Lucky Strike, MAR	97
	EBB10	10	Clone VC1.2-cl26 (AF367490) Vent-Cap, Snake Pit, MAR	99
	EBB109	1	Clone VC1.2-cl51 (AF367496) Vent-Cap, Snake Pit, MAR	98
			isolat T4-KAC-str1 (AJ575810) colonisateur, EPR 13°N	97
	EBB25	1	Endosymbionte de <i>Rimicaris exoculata</i> , Rainbow, MAR (AJ515716)	98
	EBB70	1	Symbionte de gastropode, océan Indien, clone SF_C23-F4 (AY531582)	96
	EBB26	1	<i>Sulfurospirillum carboxydovorans</i> (AY740528)	97
	EBB27	1	<i>Sulfurospirillum arcachonense</i> (Y11561)	98
	EBB34	1	Clone 3 (AY766315), Vent-Cap, Snake Pit, MAR	98
	δ Proteobacteria	EBB47	3	<i>Pelobacter acidigallici</i> (X77216) isolat MaGa12-T (DSM 2377-T)
EBB28		1	<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> (AF458778)	97
EBB100		17	<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> (AF458778)	97
EBB30		3	Y18049 <i>Desulfovibrio zosteræ</i>	92
EBB129		1	Clone IndB2-42 (AB100004), Cheminée inactive, Kairei field, océan Indien	96
EBB72		1	<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> (AF458778)	95
EBB17		1	<i>Desulfovibrio</i> sp. HS2 (AY274444)	96
EBB76		1	<i>Desulfovibrio aespoeensis</i> (X95230)	92
EBB7		2	<i>Desulfobacterium phenolicum</i> (AJ237606)	94
EBB93		3	<i>Desulfobacterium phenolicum</i> (AJ237606)	93
EBB48		1	<i>Desulfobacterium</i> sp. LSv25 (AF099056)	91
EBB2		3	<i>Desulfocapsa sulfoexigens</i> (Y13672)	96
EBB74		1	Clone IndB2-42 (AB100004), Cheminée inactive, fosse d'Okinawa, océan Indien	97
γ Proteobacteria		EBB71	1	<i>Psychromonas profunda</i> (AJ416756)
	EBB50	2	<i>Psychromonas antarcticus</i> (Y14697)	98
Cytophaga	EBB44	1	Clone SF_C9-B4 (AY531558), Océan Indien, SHOP, gastéropodes	94
	EBB32	5	Clone CS_B045 (AF419687), Guaymas, sédiments	95
Verrucomicrobia	EBB128	1	Clone P. palm A 24, <i>Paralvinella palmiformis</i> , Juan de Fuca, EPR 13°N (AJ441246)	96
Non classé	EBB110	7	Clone P. palm C70, <i>Paralvinella palmiformis</i> , Juan de Fuca, EPR 13°N (AJ441232)	89
			<i>Caldithrix abyssi</i> (AJ430587)	84

^a > 97% de similarité entre les séquences d'un même groupe, sur 700 pb approximativement.

^b Résultats de BLAST.

6 Conclusion

Ces résultats, complétés par un inventaire moléculaire réalisé sur une autre cheminée nommée 'PICO' et également prélevée sur le site Rainbow, font l'objet d'un article en préparation. La diversité des séquences obtenues des cheminées ATE2 et 'PICO' sont représentées sur les arbres phylogénétiques (réalisés par M-A Cambon-Bonavita) (Figures 4 à 7).

La diversité archéenne obtenue pour les deux cheminées était similaire (Figure 4).

De même, les ϵ -*Proteobacteria* étaient dominantes dans chacune des banques de séquences bactériennes. Toutefois, la majorité des ϵ -*Proteobacteria* étaient affiliées aux *Nautiliales* dans le cas de la cheminée 'PICO' et n'ont pas été détectées dans l'échantillon AT2E1-8. Par contre, 40% des séquences bactériennes issues de la cheminée AT2E1-8 étaient affiliées aux δ -*Proteobacteria* alors que ce groupe était peu représenté dans la seconde cheminée, et qu'un grand nombre de séquences de γ -*Proteobacteria* a été détecté dans ce dernier cas (Figure 6). Les différences observées peuvent être dues aux biais des techniques utilisées, mais peuvent aussi refléter une différence effective de la diversité microbienne entre ces deux cheminées. La cheminée AT2E est une cheminée plus ancienne que 'PICO', plus différenciée et le procédé d'échantillonnage a permis de représenter les différentes fractions minéralogiques. La cheminée 'PICO' était plus jeune, moins différenciée et traversée par des fluides plus chauds.

Les séquences issues de l'analyse DGGE mettent en évidence des groupes phylogénétiques également détectés par l'analyse de clonage. Néanmoins, leur diversité est faible. La diversité obtenue par clonage est nettement plus importante que celle obtenue par DGGE et les séquences analysées permettent un positionnement phylogénétique plus précis car elles sont généralement plus longues. Il semble que la DGGE ne permette d'accéder qu'aux microorganismes dominants de l'échantillon ou du moins aux microorganismes les plus accessibles par PCR en utilisant les amorces dédiées à la DGGE.

La diversité archéenne mise en évidence est relativement limitée, et les banques de séquences bactériennes sont dominées par les ϵ -*Proteobacteria*, comme l'ont déjà montré d'autres études portant sur la dorsale atlantique (Corre *et al.* 2001, Reysenbach *et al.* 2000). Les groupes d'*Archaea* détectés comportent tous des représentants cultivés, et correspondent à des hyperthermophiles. Il n'y a pas à ce jour d'*Archaea* mésophiles isolées des sources hydrothermales océaniques profondes. Les *Bacteria* détectées n'ont pas pu être toutes affiliées à des espèces proches isolées, et certaines appartiennent à des groupes de mésophiles. Ces microorganismes proviennent probablement des parties externes de la cheminée en contact avec l'eau de mer et par conséquent à une température plus basse.

Beaucoup de séquences sont affiliées à des groupes comportant des isolats connus pour leur capacité à utiliser l'hydrogène (*Methanococcales*) qui est particulièrement abondant dans le fluide de Rainbow, d'autres correspondent à des espèces qui utilisent le soufre (réduit par les membres hétérotrophes de l'ordre des *Thermococcales*) ou le sulfate et le thiosulfate (réduit par les *Archeoglobales* et *Desulfovibrio* sp.) comme accepteurs finaux d'électrons. Nos résultats indiqueraient l'importance de l'oxydation de l'hydrogène et la réduction des composés soufrés dans l'environnement hydrothermal océanique. Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de microorganismes thermoacidophiles ou de microorganismes méthanotrophes, malgré des conditions physico-chimiques (concentration élevée en méthane) *a priori* particulièrement adaptées pour ce type de microorganismes.

Les inventaires moléculaires, basés sur l'analyse phylogénétique des ADNr 16S, ont été récemment largement employés pour compléter la description, initialement basée sur les cultures, des communautés microbiennes des sources hydrothermales océaniques profondes. Différents types d'échantillons hydrothermaux de l'Atlantique ont été analysés : des colonisateurs *in situ* de type Vent Cap (Corre *et al.* 2001, Reysenbach *et al.* 2000), des animaux et des sédiments (López-García 2003, Zbinden & Cambon-Bonavita 2003), et récemment un échantillon minéral de type carbonate du site Lost City (Schrenk *et al.* 2004). Aucun inventaire moléculaire n'a à ce jour été reporté pour des échantillons de cheminées de type sulfure de l'Atlantique. Cependant une des limitations de l'analyse de la diversité des ARNr est qu'elle ne fournit pas de lien direct avec la physiologie et les capacités métaboliques des microorganismes détectés quand ceux-ci appartiennent à des lignées pour lesquelles il n'existe aucun représentant cultivé. De même, si une séquence environnementale d'ADNr peut être étroitement apparentée à celle d'une espèce cultivée, il n'est pas toujours possible de déduire les fonctions du microorganisme détecté.

L'approche culturale a récemment permis l'isolement à partir d'échantillons de Rainbow de deux nouvelles espèces bactériennes affiliées aux ϵ -*Proteobacteria* : *Caminibacter profundus* capable d'utiliser l'hydrogène comme source d'énergie, le soufre, le nitrate ou l'oxygène comme accepteurs d'électrons, et le CO₂ comme source de carbone (Miroshnichenko *et al.* 2004) ; *Caminibacter mediatlanticus*, anaérobie stricte qui pousse en présence de H₂ et CO₂ en utilisant le nitrate ou le soufre comme accepteur d'électrons (Voordeckers *et al.* 2005). Des séquences affiliées à ce genre ont été obtenues à partir de la cheminée 'PICO', mais pas de la cheminée AT2E. L'approche culturale reste nécessaire et complémentaire puisque, dans le cas particulier du site Rainbow, elle a permis l'isolement de nouveaux taxons bactériens qui n'ont pas été détectés dans ces deux études : *Deferribacter abyssi*, thermophile anaérobie chimiolithoautotrophe, capable d'utiliser l'hydrogène comme donneur d'électrons et le soufre, le nitrate ou le Fe(III) comme accepteur d'électrons (Miroshnichenko *et al.* 2003c), et *Vulcanithermus mediatlanticus* (Miroshnichenko *et al.*

2003b), chimiolithohétérotrophe facultative capable d'utiliser l'oxygène et le nitrate comme accepteurs d'électrons, et l'hydrogène comme source d'énergie.

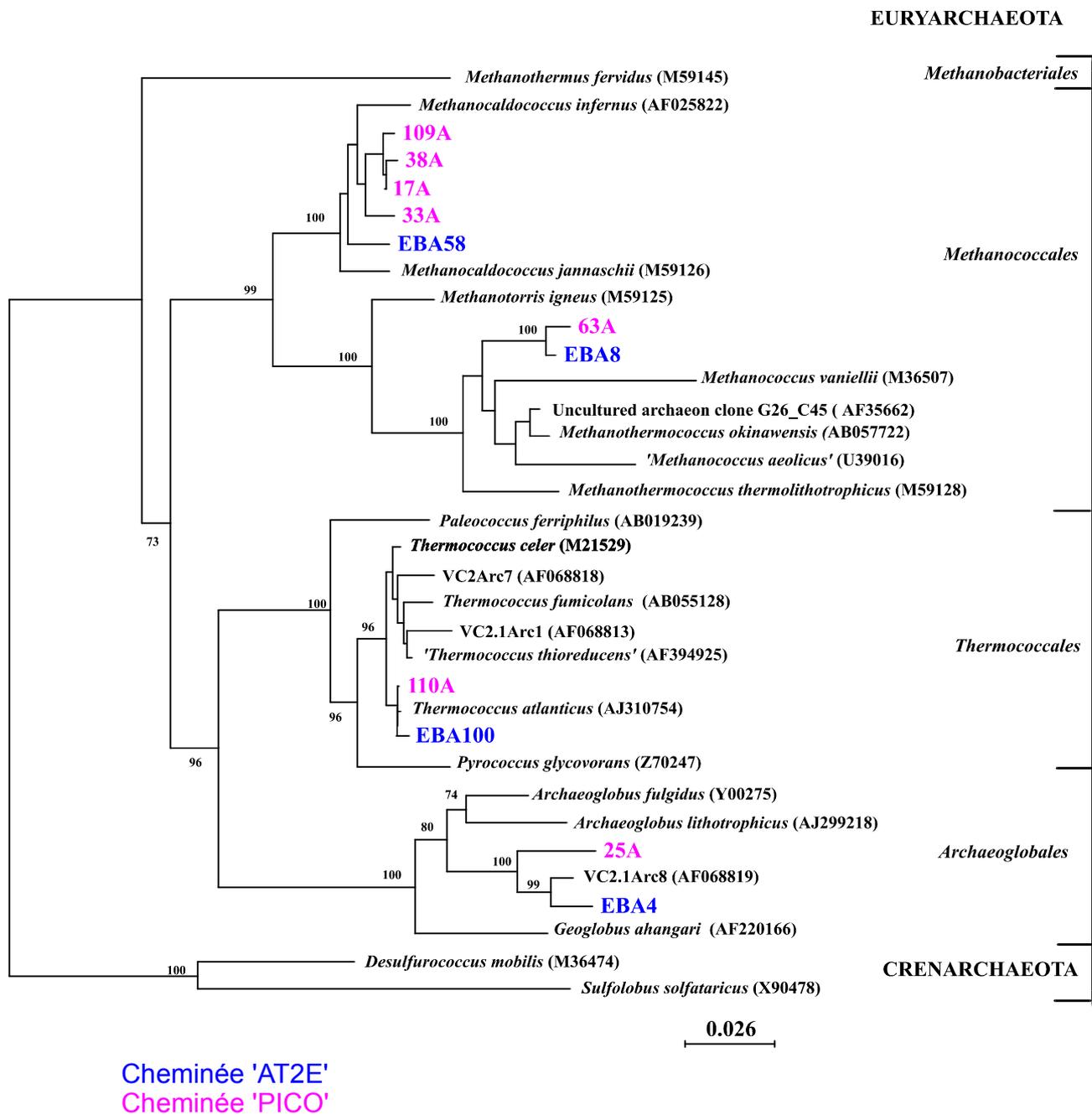


Figure 4 : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences issues des cheminées 'AT2E' et 'PICO' au sein des *Archaea*. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 500 bootstrap.

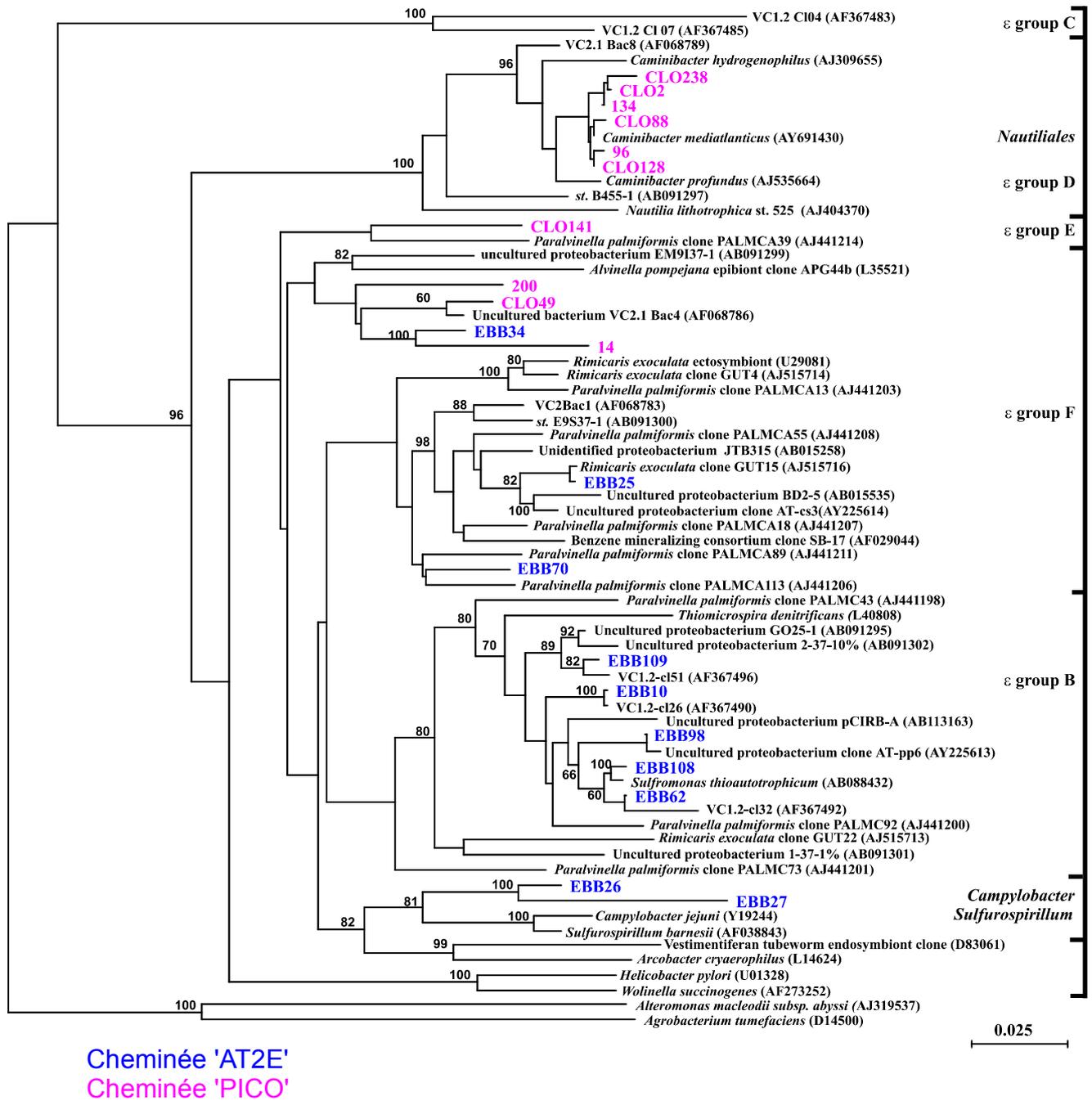


Figure 5 : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences issues des cheminées 'AT2E' et 'PICO' au sein des ϵ -Proteobacteria. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 500 bootstrap.

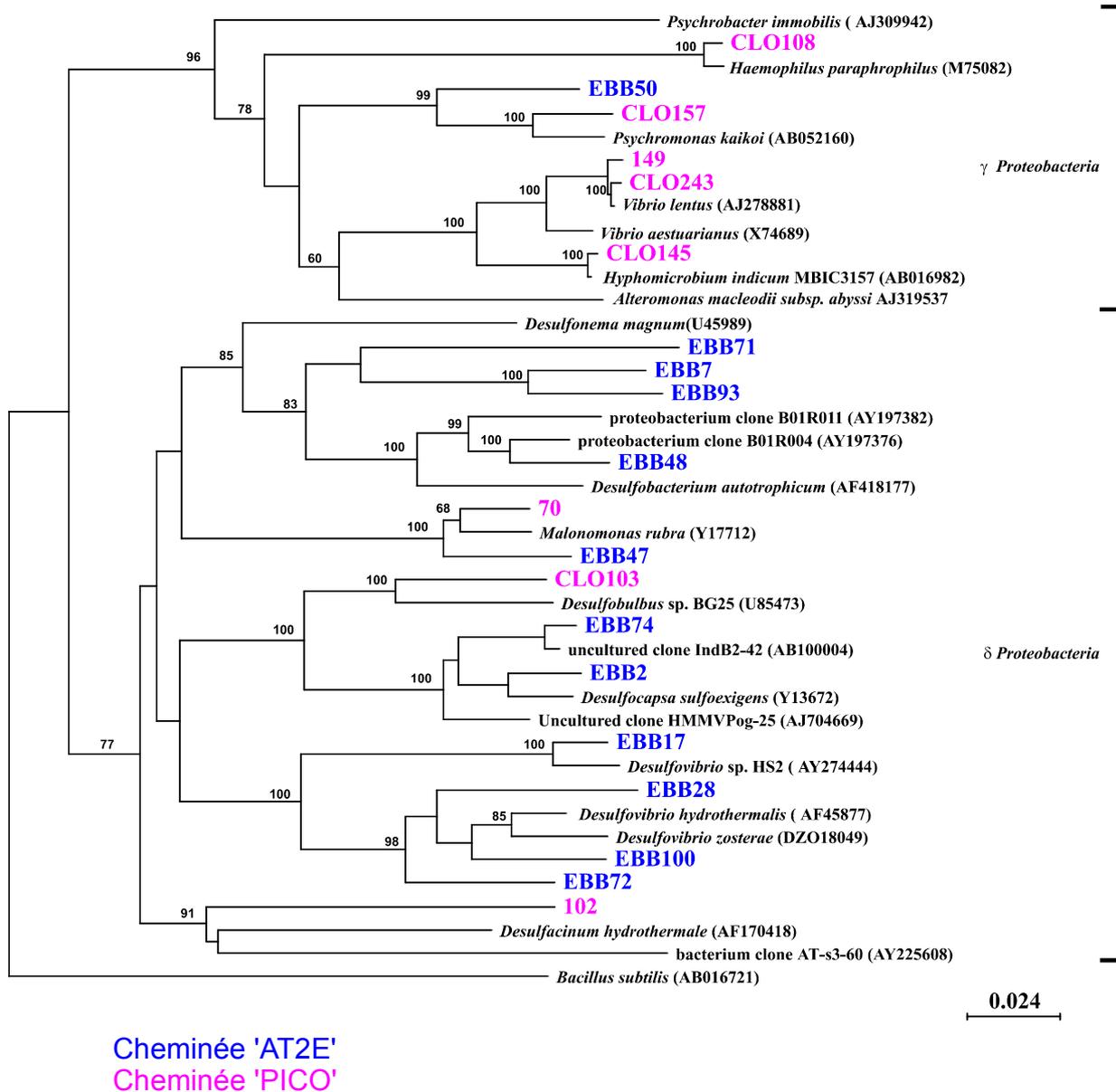


Figure 6 : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences issues des cheminées 'AT2E' et 'PICO' au sein des γ - et δ -Proteobacteria. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 500 bootstrap.

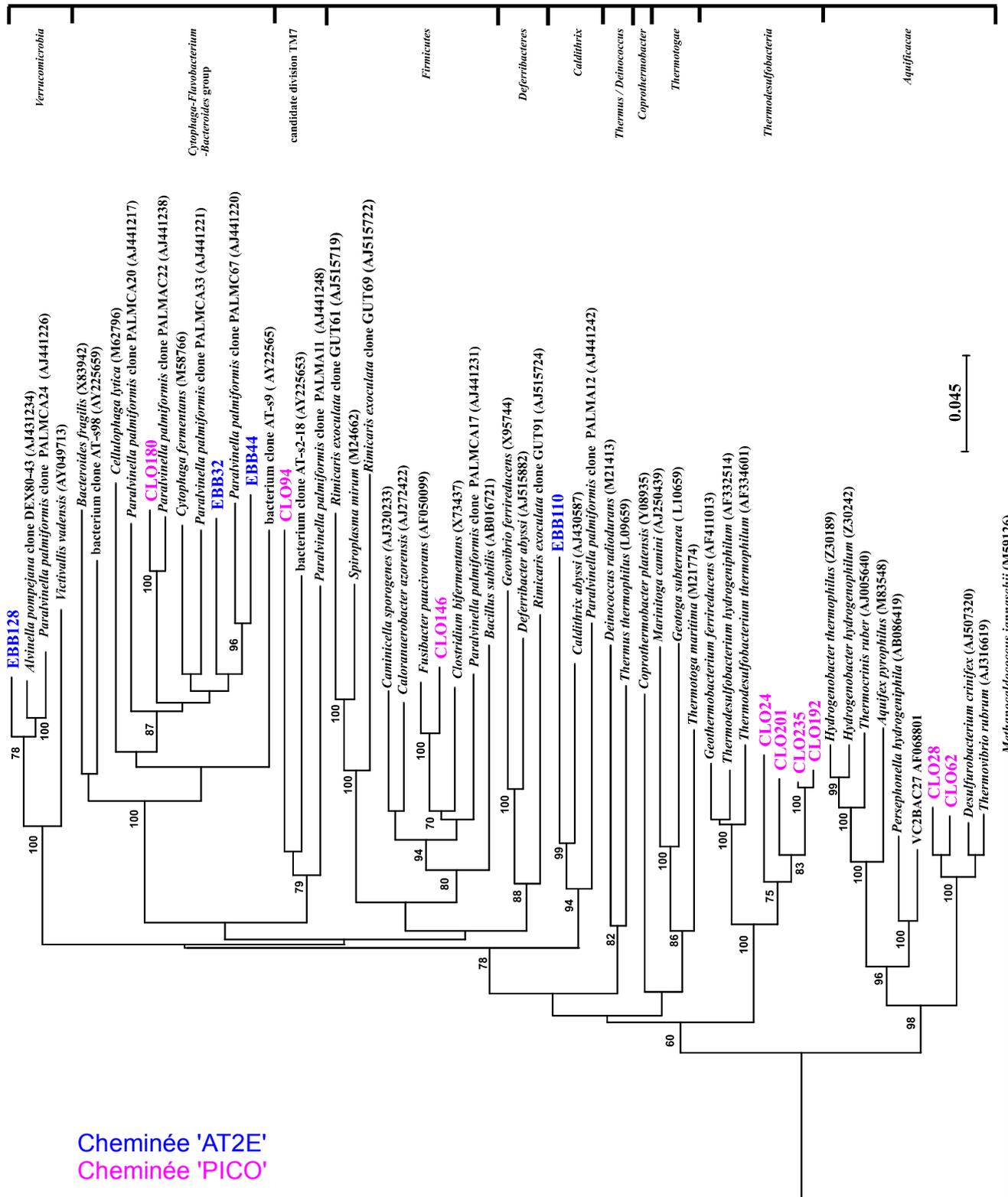


Figure 7 : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences issues des cheminées 'AT2E' et 'PICO' au sein des *Bacteria*, hors *Proteobacteria*. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 500 bootstrap.

Chapitre 2

Diversité microbienne obtenue
lors de cultures d'enrichissement
en bioréacteur gas-lift à 90°C

Article publié :

Postec, A., Urios, L., Lesongeur, L., Ollivier, B., Querellou, J. & Godfroy, A. (2005). Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems. *Current microbiology* **50**, 1-7.

Afin d'accéder aux communautés microbiennes thermophiles cultivables d'une cheminée hydrothermale océanique, nous avons choisi d'utiliser le bioréacteur gas-lift. Ce bioréacteur a été mis au point pour la culture en continu de microorganismes hyperthermophiles soufre-réducteurs de l'ordre des *Thermococcales*. A mon arrivée, le laboratoire portait un intérêt particulier aux microorganismes hétérotrophes hyperthermophiles pour l'application biotechnologique potentielle de leurs enzymes thermostables (protéases, lipases, polymérase etc.). Les conditions choisies pour cette première culture d'enrichissement en bioréacteur étaient adaptées à la croissance de ce type de microorganismes : une température de 90°C, un pH de 6,5, un balayage gazeux de la culture par de l'azote assurant le maintien de l'anaérobiose, un milieu riche contenant des substrats organiques complexes, des sucres, des sels et des minéraux ainsi que du soufre comme accepteur final d'électrons. L'addition de substrats complexes et d'une gamme diversifiée de carbohydrates visait à faire de ce milieu un milieu peu sélectif. L'application d'un taux de dilution faible du milieu de culture ($0,04 \text{ h}^{-1}$ i.e. $80 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$) allait permettre d'apporter des nutriments en continu, de minimiser le risque de lessivage de la culture et de maintenir la culture sur une longue période (50 jours dans ce cas). Bien que la croissance rapide des microorganismes dominants puisse entraîner une forte consommation des substrats, les microorganismes ayant un temps de latence et/ou une vitesse de croissance faible auraient ainsi plus de chances de pouvoir se développer dans une culture en continu. De plus, en bioréacteur les conditions physico-chimiques de la culture (température, pH) sont contrôlées en permanence, ce qui n'est pas le cas lors des cultures traditionnelles en flacon.

La diversité archéenne et bactérienne de la communauté microbienne cultivée dans le bioréacteur a été analysée en utilisant des techniques moléculaires basées sur l'analyse des ADNr 16S : par clonage sur deux échantillons prélevés à 7 et 28 jours de culture, et par DGGE sur des échantillons prélevés quotidiennement tout au long de la culture. Des analyses chimiques des sucres, acides organiques et acides aminés du milieu de culture ont également été réalisées. En parallèle, des cultures d'enrichissement ont été réalisées en flacon (expériences en batch) dans des conditions similaires (milieu F1, 90°C, pH 6,5, voir Matériel et Méthodes 2.2.3) afin de tester l'effet du "système de culture" sur la diversité des microorganismes cultivés.

Les résultats obtenus au cours de cette culture d'enrichissement en fermenteur sont présentés et discutés dans un article, à la suite duquel sont présentés des résultats complémentaires.

Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems

Anne Postec^{1,*}, Laurent Urios¹, Françoise Lesongeur¹, Bernard Ollivier²,
Joël Querellou¹, Anne Godfroy¹

(1) UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

(2) Laboratoire de Microbiologie, Institut de Recherche pour le Développement, UR 101, IFR-BAIM, Universités de Provence et de la Méditerranée, ESIL case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France

* : Corresponding author : anne.postec@ifremer.fr

Abstract:

The microflora developing during a continuous enrichment culture from a hydrothermal chimney sample was investigated by molecular methods. The culture was performed in a gas-lift bioreactor under anaerobic conditions, at 90°C and pH 6.5, on a complex medium containing sulfur as the terminal electron acceptor. Archaeal and bacterial diversity was studied. Microorganisms affiliated with the genera *Pyrococcus*, *Marinitoga*, and *Bacillus* were detected through DGGE analysis of 16S rDNA. Additional sequences phylogenetically related to *Thermococcus* and α -Proteobacteria were detected by cloning and sequencing of 16S rDNA from two samples of the enrichment culture. In comparison, the sequences retrieved from cloning analysis from an enrichment culture performed in a flask (batch condition) using the same culture medium showed that only members of the genus *Thermococcus* were cultivated. Therefore, continuous enrichment culture using the gas-lift bioreactor can be considered as an efficient and improved method for investigating microbial communities originating from deep-sea hydrothermal vents.

Introduction

Identifying the populations constitutive of microbial communities is still a major challenge. It was estimated that 90 to 99% of the organisms remained uncultivated [6], due to difficulties in reproducing their physiological niche in the laboratory. The results of molecular approaches dedicated to deep-sea hydrothermal systems were mainly obtained by 16S rDNA analysis. They showed the wealth of microbial diversity [21, 28] and the limitations of traditional cultivation techniques in improving our knowledge of the biodiversity inhabiting deep-sea hydrothermal vents. Nevertheless, *in fine*, cultivation remains necessary to describe new microbial representatives thriving in hydrothermal deep-sea vents [15, 23] and allows the study of *in situ* living microorganisms that express their physiological properties as members of the natural microflora. Since current culture techniques do not always satisfy the need of providing a good balanced picture of the microflora composition, future developments in the study of bacterial diversity should include improvements in the culture methods to approach the physico-chemical conditions of natural habitats [22]. Traditional culture attempts from hydrothermal samples were usually performed by enrichment cultures in flasks. In this study, an enrichment culture was performed in a 2-litre gas-lift bioreactor. This equipment was previously developed to grow anaerobic hyperthermophilic microorganisms [24], to study the metabolism of members of the order *Thermococcales* [14], and to develop a minimal medium for growth of these hyperthermophiles [25]. Enrichment culture in the gas-lift bioreactor was expected to allow the growth of microorganisms (i) poorly represented in the ecosystem, (ii) exhibiting a long latency phase or (iii) having not previously been cultivated so far. This could be induced by the continuous substrate supply, gas elimination by N₂ sparging, pH regulation, and long incubation time (during several weeks). It has already been reported that bacterial and archaeal populations' dynamics can be monitored in anaerobic digester according to 16S rRNA, and 16S rDNA sequences, and changes in the composition of the microflora were then highlighted [9, 17]. In this paper, we describe the use of a gas-lift bioreactor to perform an enrichment culture in controlled conditions. Amongst molecular tools available, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and 16S rDNA cloning analysis of two culture samples were chosen to investigate microbial dynamics and diversity. In comparison, enrichment cultures in flasks were performed in the same culture medium and the microflora cultivated was investigated through cloning and sequencing analysis.

Materials and Methods

Samples. During the ATOS cruise (European project VENTOX) located on the Mid-Atlantic Ridge (MAR), on the Rainbow field (36°13'N 33°54'W) at 2275 m depth, an active black smoker was collected by the Remote Operated Vehicle (ROV) Victor, and brought to the surface in a decontaminated insulated box. On board, subsamples of the chimney were crushed into an anaerobic chamber and stored in sterile serum vials filled with sterile seawater containing 0.5 mg l⁻¹ of Na₂S. The subsamples were pooled to represent the whole chimney, and used as inoculum at 2%.

Enrichment conditions in bioreactor and culture monitoring

Medium. The growth medium was the modified SME medium [29] in which yeast and peptone were replaced by 1 g l⁻¹ yeast extract; 0.5 g l⁻¹ casaminoacids; 0.4 g l⁻¹ glucose; 0.4 g l⁻¹ dextrin (from corn); 0.2 g l⁻¹ D(+)galactose; 0.2 g l⁻¹ dextran; 0.1 g l⁻¹ glycogen; 0.2 g l⁻¹ pyruvate, 0.1 g l⁻¹ acetate and 3 g l⁻¹ colloidal sulphur.

Culture conditions. The medium was sterilized by filtration (Sartroban, 0.22 µm) in 20 l Nalgene bottle containing the colloidal sulphur, previously sterilized by heating twice at 100°C for 30 min on two successive days. The culture was performed at 90°C and pH 6.5. The temperature was regulated and the pH was controlled by addition of either 1 N NaOH or 1 N HCl solutions. Moreover, the culture was sparged with N₂ (0.1 v.v⁻¹.min⁻¹) to maintain anaerobic conditions, and to eliminate possible volatile fermentation end products that might inhibit the growth of fermentative microorganisms.

Culture monitoring. The culture was maintained during 50 days. Culture samples from the bioreactor were first collected every 3 hours during the 34h-batch culture, and then daily during the continuous culture, representing a total of 51 samples. Cell concentration of each sample was determined by direct cell counting, using a Thoma chamber (0.02 mm depth) with an Olympus BH2 phase contrast microscope (×400).

Sample preservation. For each sampling, eight 1.8 ml-cryotubes of culture were frozen at -20°C in the presence of 5% DMSO. Cells were also recovered from 15 ml of culture by centrifugation (30 min at 8000×g), washed with 23 g l⁻¹ sterile NaCl, and the cell pellets were stored at -20°C.

Enrichment conditions in flask and culture monitoring. Enrichment cultures were performed in 100 ml serum vials as previously described [13], with the same medium, temperature and pH as in the bioreactor. Cell pellets for molecular analysis were recovered from 15 ml of culture in flask, after 45h and 65h of incubation, and also after a 20h subculture from the first 45h culture.

DNA extraction. Extractions were performed on frozen cells pellets following the extraction protocol of Alain *et al* [2].

16S rDNA PCR-DGGE analysis. The variable v3 region of 16S rRNA gene from extracted DNA was amplified using specific primers corresponding to both archaeal and bacterial domains. Archaeal 16S rRNA genes were amplified using primers 344F-GC and 915R [7]. Bacterial 16S rRNA genes were amplified using primers 341F-GC and 907R [19, 20]. PCR procedure and analysis of the fragments by DGGE using Bio-Rad Dcode apparatus were previously described by Muyzer *et al.* [19]. Samples were loaded onto 8% (w/v) polyacrylamide gels, in TAE-1× with a denaturing gradient ranging from 50% to 80% urea-formamide (UF) for archaeal DNA analysis, and from 35% to 80% UF for bacterial DNA analysis (100% corresponding to 7 M urea and 40% (v/v) formamide). Electrophoresis was run for 16h at 70V and stained with ethidium bromide. DGGE bands were cut out with a sterile blade. The DNA of each fragment was eluted overnight at 4°C in 50 µl sterile and purified water. One microliter of the eluted DNA of each DGGE band was reamplified, using the same conditions as above. Running an aliquot of the PCR product, in DGGE gels as described above, checked the success of this operation. The PCR products, which yielded a single band co-migrating with the original band, were then purified on a QIAquick silica-gel spin column (Qiagen) and sequenced.

16S rDNA PCR-cloning analysis. Archaeal and bacterial DNAs were amplified using universal primers and PCR procedure previously described [31]. PCR products were then checked on a 0.8% (w/v) agarose gel and directly cloned using the TOPO TA Cloning[®] kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Clone libraries were constructed by transforming *E. coli* TOP10F' cells. An archaeal and a bacterial libraries were constructed for two culture samples collected after 7 days (T7) and 28 days (T28) of culture. Three archaeal libraries were constructed from the enrichment cultures in flask.

16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis. DNA fragments obtained by DGGE were sequenced by Genome Express S.A. (Grenoble, France). Clones were cultivated overnight at 37°C on Deepwell microplates, in LB 2X medium. Plasmids were extracted using Plasmid Miniprep Kits (Qiagen) and partially sequenced. Sequences were compared to those available in databases, using the BLAST [5] network service to determine phylogenetic affiliations, aligned with the rDNA sequences from the RDP (Ribosomal Database Project), using the GCG CLUSTALW program [30], and refined manually using the SEAVIEW program [12]. Trees were constructed using the PHYLO_WIN program, on the basis of evolutionary distance [27] and maximum likelihood methods [11]. The robustness of inferred topologies was tested by the bootstrap resampling of trees [10] calculated on the basis of the evolutionary distance, neighbor-joining algorithm with Jukes-Cantor correction [16] and maximum likelihood. If related sequences displayed

more than 97% sequence similarity, only one of the sequences was retained for phylogenetic analysis. One representative of each unique phylotype was completely sequenced.

Results

Monitoring of the enrichment culture in bioreactor. The bioreactor was inoculated at 2% (vol/vol) with a chimney sample suspension. Very low cell densities were measured during the first 34 hours of batch. Then a dilution rate of 0.04 h^{-1} (80 ml h^{-1}) was applied. The period of batch culture was fixed arbitrarily in order to avoid washing out of the cells before they had become adapted to the growth conditions. Cell density stabilized at around $5 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$ until 105 h of culture. By 124 h, cell number had increased to $1.8 \times 10^8 \text{ cell ml}^{-1}$. This was associated with H_2S production (detected using Zn acetate strips). Amongst observed morphologies, coccoid cells, single or in pairs, were dominant throughout the enrichment culture. Short rod-shaped cells appeared singly or in chains within an outer sheath-like structure, comparable to the 'toga' specific to *Thermotogales* [1]. From 350 h until the end of the culture, only single or paired coccoid cells were observed.

DGGE monitoring of the culture in bioreactor. Total DNA was successfully extracted on samples between the 4th to the 50th day of culture. From the earlier samples, difficulties in DNA extraction were encountered, probably due to the very low cell density. The DGGE procedure was tested with 16S rDNA fragments from reference strains. Conditions were optimised to analyse separately archaeal and bacterial fragments. Fragments from the two *Pyrococcus* species, *P. abyssi* and *P. glycovorans*, could not be separated (data not shown). Archaeal 16S rDNA gene were amplified with the DGGE primers from 29 distinct culture samples covering all the culture duration. One band was obtained for each sample, at the same height in all cases. 12 bands were excised, amplified by PCR, checked on a DGGE gel, and directly sequenced. A similarity of more than 97% was shared between those sequences on about 320 bp of the variable v3 region of the 16S rRNA gene. The type sequence Apa10 (Table 1) presented 100% identity on 417 bp with seven matching organisms from the BLAST analysis, all belonging to the *Pyrococcus* genera. As a result only sequences related to *Pyrococcus* could be detected throughout the culture. Using the same procedure, the v3 region of bacterial 16S rDNAs was amplified with specific DGGE primers (Table 1). Bacterial 16S rDNA genes were amplified successfully from nine distinct culture samples, from day 5 to day 35. Several dense bands were obtained at different heights. Amongst the 14 sequences obtained from excised bands, five of them represented by the sequence Apb7 (Table 1), matched by a BLAST analysis with sequences of the *Bacillus* genus. These sequences were retrieved from samples between day 5 and 9. Nine sequences obtained from excised bands were closely related to the genus *Marinitoga* and

were retrieved between day 7 and 35. DGGE analysis revealed the phylogenetic affiliation of the dominant cultivated strains and showed a larger diversity among *Bacteria* than *Archaea*.

Cloning-sequencing analysis of the culture in bioreactor. In the two archaeal libraries corresponding to the two culture samples T7 and T28, all the sequences belonged to the order *Thermococcales* (Fig. 2.). Within 59 clones partially sequenced from the earlier culture sample T7, two phylotypes were identified and were closely related to the genus *Pyrococcus*. The type sequences T7a-44 and T7a-60 shared 99% of similarity with *Pyrococcus horikoshii* as well as with *Pyrococcus abyssi* and *Pyrococcus furiosus* based on about 1500 pb. However, the complete sequences of these two representative clones shared only 96% of similarity, so that two distinct *Pyrococcus* species could have been cultivated. Within 49 clones partially sequenced from the second culture sample T28, 4% represented by the sequence type T28a-17 were related to the genus *Pyrococcus*, while 96% were closely related to the genus *Thermococcus*, represented by the sequence T28a-18 (Fig. 2.). The nearest strain according to the BLAST analysis was “*Thermococcus sulfurophilus*” (AF394925). Among the T7 bacterial library, six phylotypes were defined: one within the γ -*Proteobacteria* (3% of the sequences), two within the ϵ -*Proteobacteria* (38% of the sequences), two within the *Bacillus/Clostridiales* group (36% of the sequences), and one within the *Thermotogales* order (23% of the sequences) (Fig. 3.). Interestingly, all the ϵ -*Proteobacteria* sequences were affiliated to uncultured bacteria, all originated from deep-sea hydrothermal environments. Within the *Bacillus/Clostridiales* group and the *Thermotogales* order, the retrieved sequences were related (with 99% of identity) to *Caminicella sporogenes* and *Marinitoga piezophila* respectively. Within the T28 bacterial library, 17% of the sequences were affiliated to uncultured ϵ -*Proteobacteria*. Nine per cent of the sequences were closely related to the genus *Caminicella*, and 61% to the genus *Marinitoga*. No sequences related to γ -*Proteobacteria* were retrieved in the T28 bacterial library and 13% of the sequences were assigned to deep-sea hydrothermal sequences of the *Aquificales* order, which were not retrieved in the earlier culture sample.

Cloning-sequencing analysis of the cultures in flask. The medium was inoculated at 2% (vol/vol) with the same suspension of chimney sample. Total DNA was successfully extracted from the enrichment cultures in flask, after 45h and 65h of incubation at 90°C, and from a 20h subculture from the 45h culture. Only archaeal 16S rRNA gene could be amplified. Three archaeal clone libraries were constructed and 64 clones of each were sequenced. As a result, the sequences obtained were all affiliated to the *Thermococcus* genus. The nearest described species according to the BLAST analysis was *Thermococcus barophilus* (AY099172). No *Pyrococcus* neither bacteria could be detected among the strains cultivated in batch.

Discussion

Compared to conventional enrichment culture in batch, a novel approach was used to investigate the microbial diversity of a hydrothermal vent chimney sample. The use of the gas-lift bioreactor technology to perform a continuous culture provide a controlled laboratory environment for the enrichment and cultivation of different microbial groups in hyperthermophilic conditions (90°C). pH and temperature were continuously monitored and adjusted. In addition, the culture was continuously sparged with N₂, thus homogenising the medium and also eliminating possible toxic products from fermentation processes. Since the medium was continually renewed, the enrichment culture could be maintained a long time during which the analysis of the microbial population was performed. A dynamics in the cultivated microflora could be highlighted all through the enrichment culture in bioreactor, as it was already observed in anaerobic digestors [8, 17]. Actually, an evolution of the cell morphologies including rods and cocci could be observed, and modifications of the microbial diversity was ascertained through 16S rDNA sequences analysis.

The diversity of microbial population was first assessed using the DGGE technique. Here we demonstrate the efficiency of the DGGE technique for studying thermophilic *Archaea* and *Bacteria* diversity and monitoring the population dynamics. Using this technique, we demonstrated that 16S rDNA sequences, retrieved from the continuous culture, were closely related to members of the genera *Bacillus*, *Marinitoga* and *Pyrococcus*. Cloning analysis of the microbial population was performed on two culture samples at day 7 (T7) and at day 28 (T28). Similarly to the DGGE technique, *Pyrococcus*, *Caminiella*, and *Marinitoga* related sequences were detected at day 7, whereas *Pyrococcus* and *Marinitoga* were detected at day 28. Cloning analysis revealed a larger biodiversity than DGGE, since members of *Thermococcus*, γ - and ϵ -*Proteobacteria* and *Aquificales* were only detected by cloning. Therefore our results confirm the need for combining several molecular methods to avoid the bias inherent in each one and to have a better knowledge of the microbial diversity.

All the archaeal sequences, detected by DGGE and by cloning, were phylogenetically related to the order *Thermococcales*, and more specifically to the genera *Pyrococcus* and *Thermococcus*, known as heterotrophic and hyperthermophilic microorganisms. Interestingly, 16S rDNA sequences analysis showed that the *Thermococcus* strain enriched in flask was different from the one detected in bioreactor. Actually, the closest relative of retrieved *Thermococcus* 16S rDNA sequences from cultures in flask was *Thermococcus barophilus* [18], whereas sequences retrieved from the bioreactor were close to “*Thermococcus sulfurophilus*”, a sulphur-reducing archaeon also originated from the Rainbow site. These results emphasise the interest of using a continuous bioreactor to enrich cultures since providing evidence of a different diversity of *Thermococcus* strains as compared to that obtained in batch conditions. Beside their detection in the continuous bioreactor by molecular techniques, the two novel archaeal strains belonging to the genera *Pyrococcus* and *Thermococcus* have also been isolated by the dilution-to-extinction technique [1].

Experiments conducted to look for the occurrence of microorganisms of the domain *Bacteria* indicated that no bacterial sequences could be obtained from the batch cultures in flask. In contrast, studies within the continuous bioreactor revealed a large bacterial diversity through the cloning-sequencing analysis of 16S rDNA (Fig. 2.). This again confirms the interest of using a different methodological approach to investigate the biodiversity of microorganisms inhabiting deep-sea hydrothermal vents. Amongst the 16S rDNA sequences detected in this study, close relatives of *Caminiella sporogenes* [3] and *Marinitoga piezophila* [1] were found. These species are known to grow at temperatures much lower than 90°C (maximal growth temperature of 65°C and 75°C respectively). The presence of these bacteria at 90°C may indicate (i) the existence of unknown species belonging to both genera and thriving in these conditions, (ii) a possible growth of close representatives of previously isolated *Caminiella* and *Marinitoga* spp. under hyperthermophilic conditions due to thermoprotective molecules released by the other members of the enrichment culture, or (iii) unknown interactions between bacteria and archaeons. Many sequences retrieved during this study were affiliated to uncultivated microorganisms belonging to the ϵ -*Proteobacteria*. They were in particular closely related to the hydrothermal sequences VC2.1 Bac31 and VC2.1 Bac1, from the Snake Pit deep-sea vent site, on the Mid-Atlantic Ridge [26]. In all the deep-sea vent microbial communities studied to date, ϵ -*Proteobacteria* phylotypes were shown to be dominant, accounting for 40-98% of the bacterial clone libraries. The ϵ -*Proteobacteria* detected in our enrichment culture at 90°C were adapted at higher temperatures than those described for all ϵ -*Proteobacteria* characterised so far, which do not grow over 70°C in pure culture [4]. These results confirm the importance of pursuing efforts for isolating new populations of hyperthermophiles from their natural environments. With regards to numerous reports, it is now more and more obvious that the combination of both molecular approach and cultivation is the best way so far to assess the microbial diversity of hydrothermal vent chimney. Molecular studies suffer from the drawback that metabolic properties can only rarely be inferred from the 16S rRNA sequences data alone. Likewise, limitations of molecular tools must be kept in mind [2]. In this respect, the use of both cultivation and molecular methods may help to answer these questions.

The gas-lift bioreactor technology appears therefore to be an improved method to perform enrichment cultures. During the enrichment culture in the continuous bioreactor, different microorganisms were cultivated and a much larger diversity was exhibited as compared to cultures performed in flasks (batch conditions). Even new microorganisms inhabiting deep-sea hydrothermal vent could be evidenced, and isolation of two strains by subcultures in flask has already been successful. The use of the bioreactor for further enrichment experiments should contribute to better simulate hydrothermal physiological niches in the laboratory, and to reproduce environmental perturbations *in vitro* (temperature, pH, O₂, nature and concentration of the substrates ...). This should improve our understanding of the key ecological roles played by microorganisms in the hydrothermal ecosystems.

Nucleotide sequence accession numbers

The EMBL accession numbers of the sequences used in this study are AJ585953 to AJ585977.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank P.M. Sarradin, chief scientist of the ATOS cruise, as well as the captain and crew of the Atalante and the Victor team. We thank Dr P. Roger and L. Casalot (IRD) for revising the manuscript. This work was supported by Ifremer, European VENTOX Program and Région Bretagne.

Literature cited

1. Alain K, Marteinsson VT, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, Prieur D, Birrien JL (2002) *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1331-1339
2. Alain K, Olagnon M, Desbruyeres D, Page A, Barbier G, Juniper SK, Querellou J, Cambon-Bonavita MA (2002) Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol* 42:463-476
3. Alain K, Pignet P, Zbinden M, Quillevere M, Duchiron F, Donval JP, Lesongeur F, Raguènes G, Crassous P, Querellou J, Cambon-Bonavita MA (2002) *Caminiella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1621-1628
4. Alain K, Querellou J, Lesongeur F, Pignet P, Crassous P, Raguènes G, Cuff V, Cambon-Bonavita MA (2002) *Caminiibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1317-1323
5. Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215:403-410
6. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169
7. Casamayor EO, Schäfer H, Baneras L, Pedros-Alio C, Muyzer G (2000) Identification and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lake : Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66:499-508
8. Delbes C, Moletta R, Godon JJ (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction - single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol* 2:506-515
9. Delbes C, Moletta R, Godon JJ (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 35:19-26
10. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
11. Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17:368-376
12. Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* 12:543-548
13. Godfroy A, Meunier JR, Guezennec J, Lesongeur F, Raguènes G, Rimbault A, Barbier G (1996) *Thermococcus fumicolans* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeum isolated from deep-sea hydrothermal vent in North Fiji basin. *Int J Syst Bacteriol* 46:1113-1119

14. Godfroy A, Raven NDH, Sharp RJ (2000) Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. FEMS Microbiol Lett 186:127-132
15. Jeanthon C (2000) Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. Antonie van Leeuwenhoek 77:117-133
16. Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In H N Munro, editor, Mammalian Protein Metabolism, Academic Press, 21-132
17. Leclerc M, Delbes C, Moletta R, Godon JJ (2001) Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. FEMS Microbiol Ecol 34:213-220
18. Marteinson V, Birrien J, Reysenbach A, Vernet M, Marie D, Gambacorta A, Messner P, Sleytr U, Prieur D (1999) *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. Int J Syst Bacteriol 49:351-359
19. Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695-700
20. Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73:127-141
21. Nercessian O, Reysenbach AL, Prieur D, Jeanthon C (2003) Archaeal diversity associated with *in situ* samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). Environ Microbiol 5:492-502
22. Palleroni NJ (1997) Prokaryotic diversity and the importance of culturing. Antonie van Leeuwenhoek 72:3-19
23. Querrelou J, Alain K, Cambon-Bonavita M-A (2001) Thermophiles from deep-sea hydrothermal vents. Vie Milieu 51:161-172
24. Raven N, Ladwa N, Sharp R (1992) Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. Appl Microbiol Biotechnol 38:263-267
25. Raven NDH, Sharp RJ (1997) Development of defined and minimal media for the growth of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* Vc1. FEMS Microbiol Lett 146:135-141
26. Reysenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J (2000) Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic ridge hydrothermal vent. Appl Environ Microbiol 66:3798-3806
27. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406-425
28. Schrenk MO, Kelley DS, Delaney JR, Baross JA (2003) Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. Appl Environ Microbiol 69:3580-3592
29. Sharp RJ, Raven NDH. 1997. Isolation and growth of hyperthermophiles, p. 23-51. In P. M. Rhodes and P. F. Stanbury (ed.), Applied Microbial Physiology : A practical approach. IRL Press, Oxford University press.
30. Thompson J, Higgins D, Gibson T (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673-4680
31. Wery N, Cambon-Bonavita MA, Lesongeur F, Barbier G (2002) Diversity of anaerobic heterotrophic thermophiles isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. FEMS Microbiol Ecol 41:105-114

Figures and tables

Table 1. Identification of bands obtained from DGGE after BLAST analysis.

Fig. 1. Phylogenetic relationship of archaeal 16S rDNA sequences as determined by neighbor-joining analysis. *Palaeococcus ferriphilus* was used as the outgroup. The numbers at the nodes are the bootstrap values (as percentages). Bootstrap values above 70% are displayed. For the analysis, 1402 sites were used, with 500 bootstrap replicates. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position.

Fig. 2. Phylogenetic relationship of bacterial 16S rDNA sequences as determined by neighbor-joining analysis. The outgroup used was *Aquifex pyrophilus*. The numbers at the nodes are the bootstrap values (as percentages). Bootstrap values above 70% are displayed. For the analysis, 404 sites were used, with 500 bootstrap replicates. Scale bar indicates the expected number of changes per sequence position.

Table 1.

Band	Number of bands associated ^d	Closest relative	% similarity
Apa10 ^a	12	<i>Pyrococcus abyssi</i> L19921	100
Apb7 ^b	5	<i>Bacillus</i> sp. USC14 AF346495	99
Apb9 ^c	9	<i>Marinitoga piezophila</i> AF326121	99

^a 417 bp used for BLAST analysis

^b 553 bp used for BLAST analysis

^c 555 bp used for BLAST analysis

^d more than 97% of similarity between the sequences of a same group

Fig. 1.

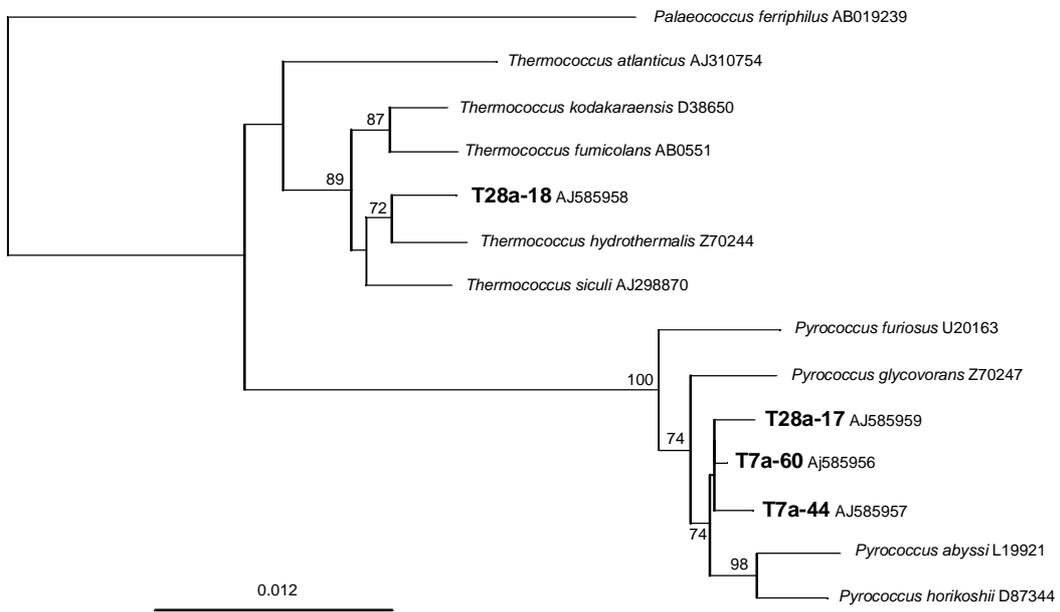
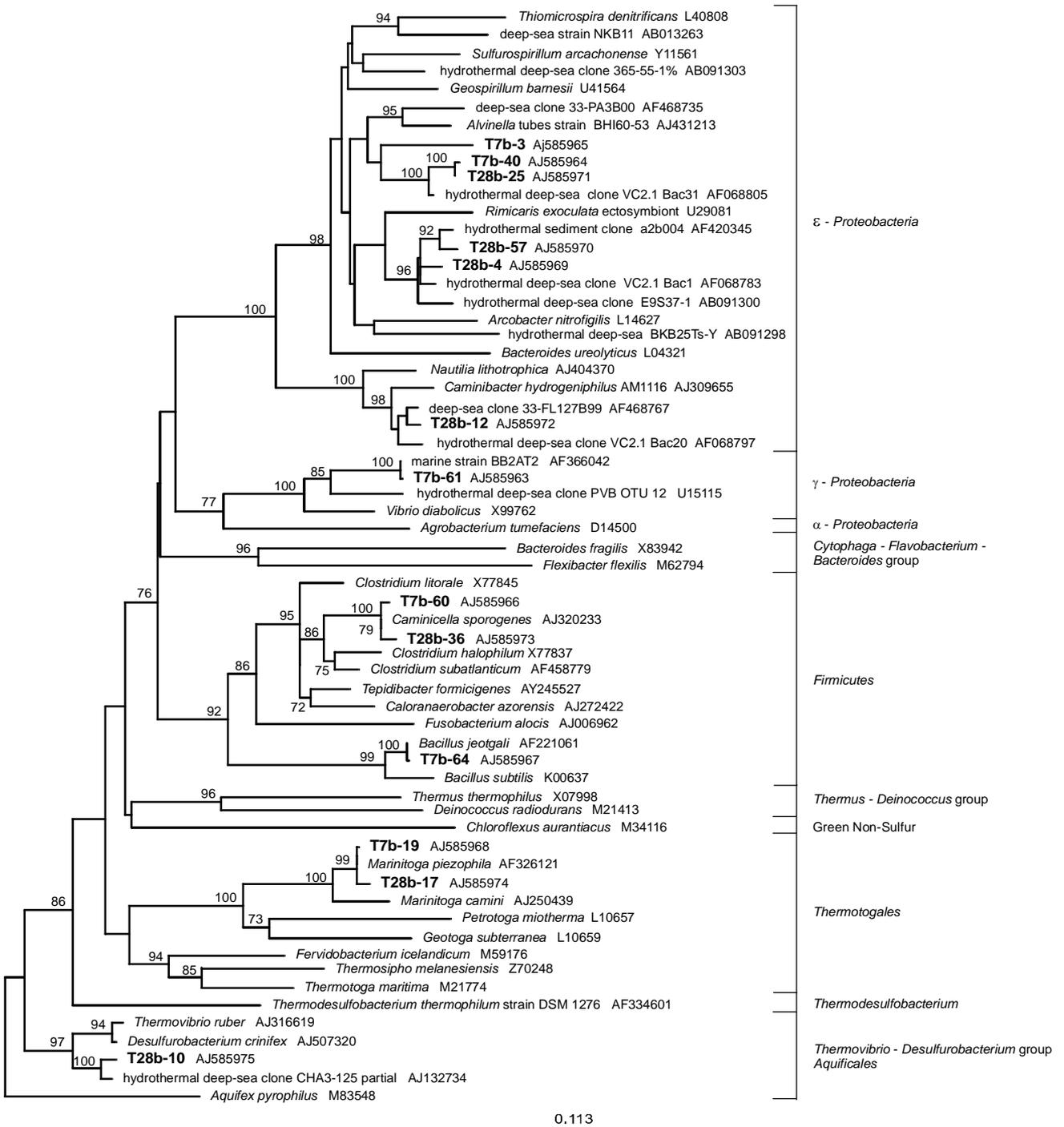


Fig. 2.



1 Tableaux et figures complémentaires

Tableau 1 : Distribution et affiliation phylogénétique des séquences clonées d'ADNr 16S archéennes. T7 et T28 correspondent aux échantillons de culture prélevés au 7^e et 28^e jour de culture respectivement.

Echantillon	Affiliation phylogénétique	Séquence type ^a	Nombre de clones (et %)	Représentant le(s) plus proche(s)	Identité (%) ^b
T7	<i>Pyrococcus</i>	T7a-60	53 (90%)	<i>Pyrococcus</i> sp. MV1019 AJ419868	99
		T7a-44	6 (10%)	<i>Pyrococcus</i> sp. MV1019 AJ419868	99
		T28a-17	1 (2%)	<i>Pyrococcus abyssi</i> AJ248283	99
T28	<i>Pyrococcus</i>			<i>Pyrococcus horikoshii</i> AP000001	99
				<i>Pyrococcus furiosus</i> AE010139	99
		T28a-24	1 (2%)	<i>Pyrococcus</i> sp. MV1019 AJ419868	97
	<i>Thermococcus</i>	T28a-18	45 (92%)	' <i>Thermococcus sulfurophilus</i> ' AF394925	99
		T28a-82	1 (2%)	' <i>Thermococcus sulfurophilus</i> ' AF394925	98
		T28a-87	1 (2%)	' <i>Thermococcus sulfurophilus</i> ' AF394925	97

^a > 97% de similarité entre les séquences d'un même phylotype.

^b résultats de BLAST.

Tableau 2 : Distribution et affiliation phylogénétique des séquences clonées d'ADNr 16S bactériennes. T7 et T28 correspondent aux échantillons de culture prélevés au 7^e et 28^e jour de culture respectivement.

Echantillon	Affiliation phylogénétique	Séquence type ^a	Nombre de clones (et %)	Représentant le(s) plus proche(s)	Identité (%) ^b
T7	γ - <i>Proteobacteria</i>	T7b-61	1 (3%)	Marine gamma <i>Proteobacterium</i> BB2AT2 AF366042	98
		T7b-40	14 (35%)	Uncultured bacterium VC2.1 Bac31 AF068805	98
	ϵ - <i>Proteobacteria</i>	T7b-3	1 (3%)	Uncultured bacterium VC2.1 Bac31 AF068805	94
	<i>Bacillus/</i>	T7b-60	13 (33%)	<i>Caminiella sporogenes</i> AJ320233	99
	<i>Clostridiales</i>	T7b-64	1 (3%)	<i>Bacillus jeotgali</i> AF221061	97
	<i>Thermotogales</i>	T7b-19	9 (23%)	<i>Marinitoga piezophila</i> AF326121	99
	T28		T28b-4	1 (4%)	<i>Proteobacterium</i> Dex60-82 AJ431218
		T28b-57	1 (4%)	Uncultured <i>Proteobacterium</i> isolate a2b004 AF420345	98
ϵ - <i>Proteobacteria</i>		T28b-25	1 (4%)	Uncultured bacterium VC2.1 Bac31 AF068805	95
		T28b-12	1 (4%)	Uncultured bacterium VC2.1 Bac30 AF068804	96
<i>Bacillus/</i>		T28b-36	2 (9%)	<i>Caminiella sporogenes</i> AJ320233	99
<i>Clostridiales</i>					
<i>Thermotogales</i>		T28b-17	14 (61%)	<i>Marinitoga piezophila</i> AF326121	98
<i>Aquificales</i>	T28b-10	3 (13%)	Uncultured eubacterium CHA3-125 AJ132734	97	

^a > 97% de similarité entre les séquences d'un même phylotype.

^b résultats de BLAST.

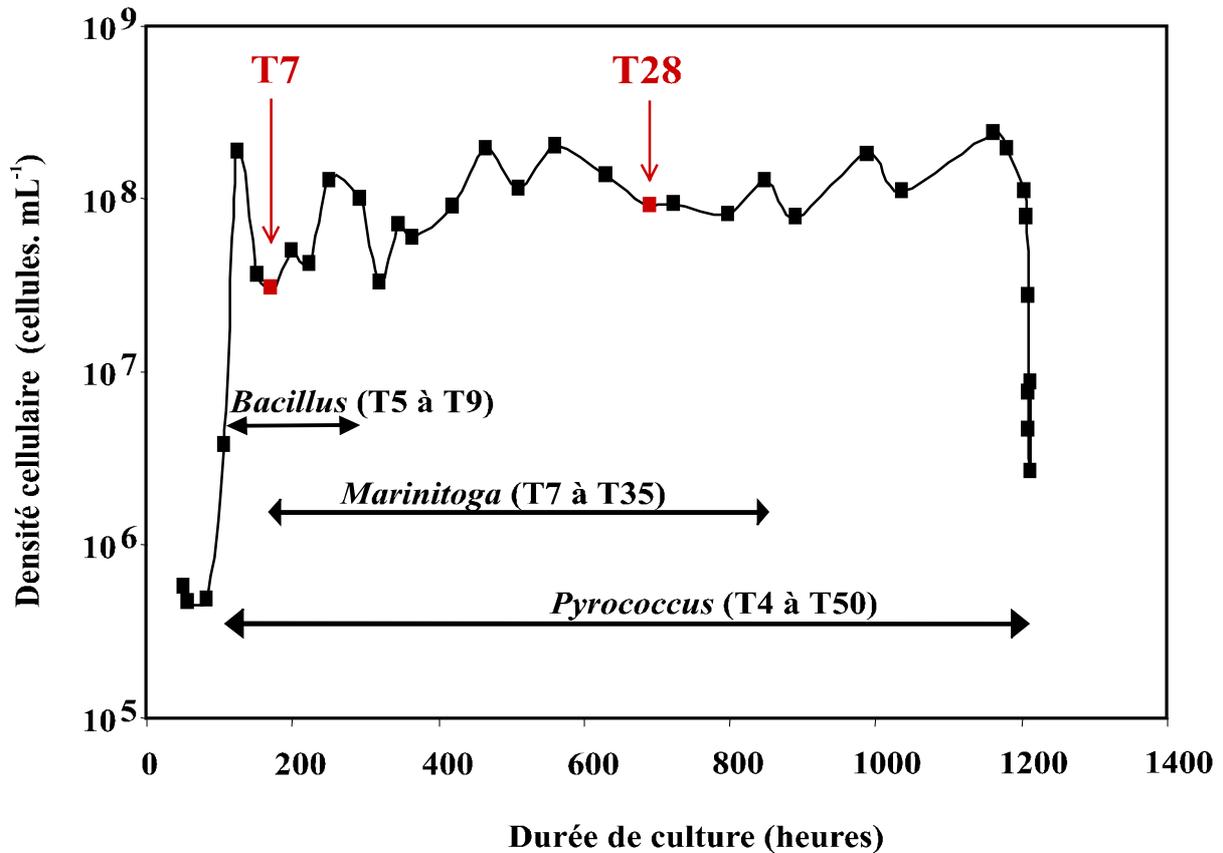


Figure 1 : Evolution de la densité cellulaire au cours de la culture d'enrichissement en continu. Après 34 h de culture en batch dans le bioréacteur, un taux de dilution $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ a été appliqué. Des banques de clones ont été réalisées à partir des échantillons T7 (prélevé au 7^e jour de culture) et T28 (prélevé au 28^e jour de culture). Au-dessus des flèches sont indiquées les affiliations phylogénétiques des séquences issues de l'analyse par DGGE, et les périodes au cours desquelles elles ont été détectées. Après 41 jours de culture, le taux de dilution a été augmenté étape par étape jusqu'à lessivage complet de la culture (991 h : $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, 1131 h : $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$, 1181 h : $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$, 1205 h : $D = 1 \text{ h}^{-1}$, 1210 h : $D = 2 \text{ h}^{-1}$).

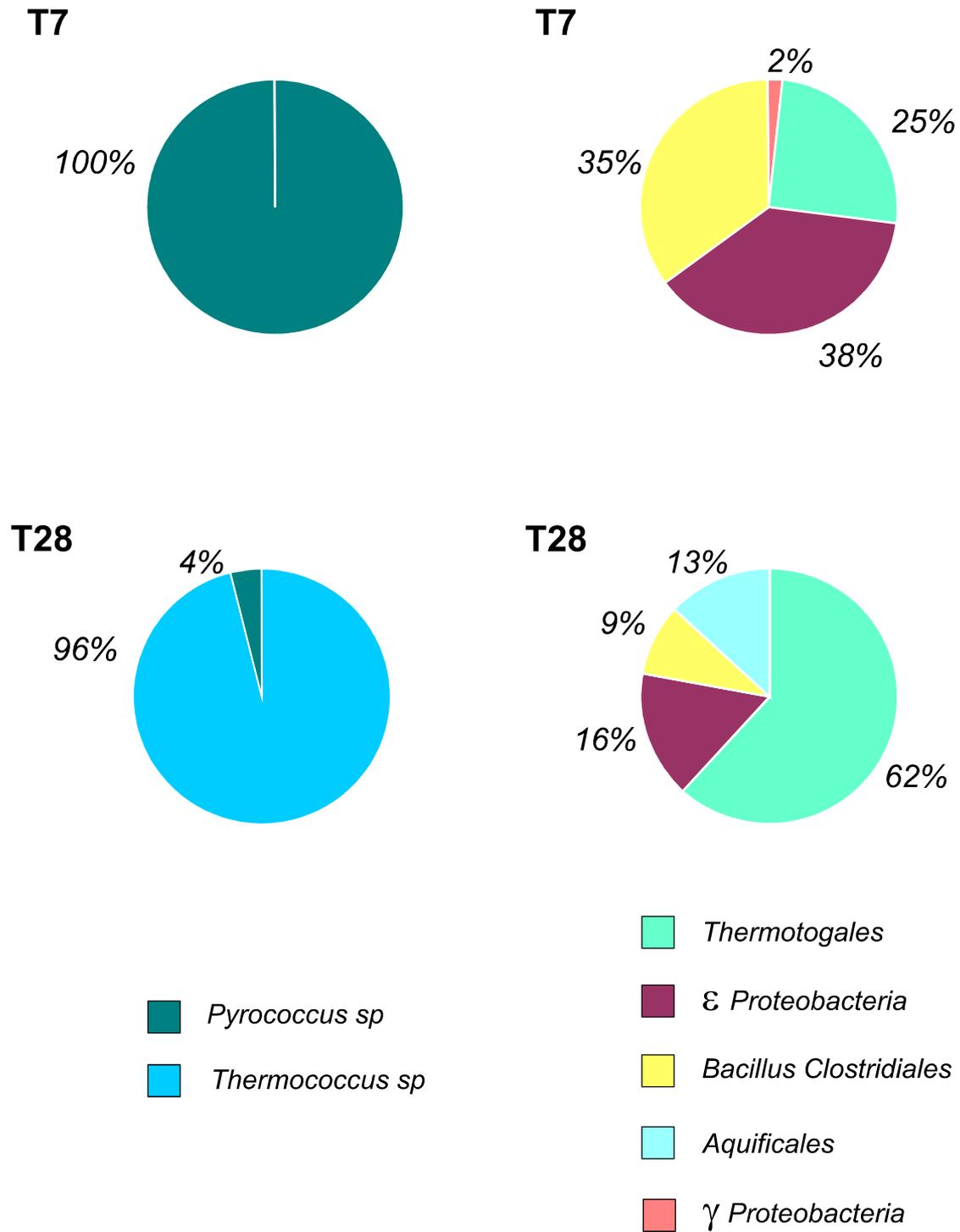


Figure 2 : Distribution des séquences archéennes et bactériennes, en fonction de leur affiliation phylogénétique, obtenues dans les banques de clones correspondant aux échantillons de culture d'enrichissement en bioréacteur T7 et T28 (prélevés au 7^e et 28^e jour de culture respectivement).

2 Résultats complémentaires et discussion

Des microorganismes affiliés au genre archéen hyperthermophile *Pyrococcus*, ainsi qu'aux genres bactériens *Marinitoga* et *Bacillus* ont été détectés grâce à la technique de DGGE. Cette technique a également permis de mettre en évidence ces microorganismes dans différents échantillons prélevés au cours de la culture, d'une durée totale de 50 jours :

- une (ou des) espèce(s) appartenant au genre *Pyrococcus* sp. a été détectée dans les échantillons T4 à T50 (i.e. du 4^{ème} au 50^{ème} jour de culture),
- des espèces affiliées au genre *Marinitoga* ont été détectées dans les échantillons T7 à T35 et des séquences affiliées au genre *Bacillus* dans les échantillons T5 à T9.

Le clonage des ADNr 16S réalisé sur deux échantillons (T7 et T28) a permis d'obtenir de nouvelles séquences donnant ainsi une image plus large de la diversité de la microflore cultivée dans le bioréacteur. En plus des espèces détectées par la DGGE, l'analyse des séquences obtenues par clonage a permis de mettre en évidence des membres du genre archéen hyperthermophile *Thermococcus*, ainsi qu'un groupe de séquences bactériennes diverses correspondant à des ϵ -*Proteobacteria* et affiliées à des clones environnementaux (i.e. microorganismes incultivés). Des membres des γ -*Proteobacteria* ainsi que des *Aquificales* ont également été détectés par clonage.

Une diversité microbienne plus large a donc été mise en évidence grâce aux ADNr 16S clonés. Des plus les fragments clonés peuvent fournir des séquences ribosomales *quasi* complètes (~1500 pb) et ainsi une information phylogénétique plus précise que les courts fragments analysés par DGGE (570 pb). Cependant, la DGGE s'est avérée utile pour le suivi de populations sur toute la durée de la culture. La combinaison d'outils différents a été judicieuse, pour d'une part identifier les microorganismes présents dans la culture d'enrichissement en bioréacteur, et d'autre part pour suivre l'évolution de la population au cours du temps.

Les cultures d'enrichissement en flacon, réalisées dans des conditions identiques à celles du bioréacteur (même milieu, mêmes température et pH, même inoculum) n'ont pas permis d'accéder à une diversité microbienne aussi importante que celle obtenue dans le bioréacteur puisque toutes les séquences clonées et séquencées correspondaient uniquement au genre archéen *Thermococcus*. Compte tenu de la bibliographie et de l'expérience du laboratoire concernant ces microorganismes, il s'avère que les espèces appartenant à l'ordre des *Thermococcales* sont cultivées de façon majoritaire dans des conditions similaires (gamme de température de 80-90°C, anaérobiose et milieu riche), à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales.

La réalisation de cultures en bioréacteur gas-lift et en continu apparaît donc performante pour accéder à des populations microbiennes plus diversifiées à partir d'un échantillon de cheminée hydrothermale.

Au sein de la diversité archéenne détectée, les séquences sont étroitement apparentées à celles de membres cultivés de l'ordre des *Thermococcales*. La DGGE a permis la mise en évidence de *Pyrococcus* sur la quasi totalité de la culture, alors que des séquences de *Thermococcus* ont également été détectées par clonage à T30.

Les essais d'isolement par réalisation de sous-cultures en flacon (voir aussi plus loin) ont permis d'isoler avec succès deux souches, l'une notée AT1261 dont l'ADNr 16S présente 99% d'identité avec celui de '*Pyrococcus* MV1019' (également détecté parmi les clones), et l'autre notée AT1260 dont l'ADNr 16S partage 100% d'identité avec '*Thermococcus sulfurophilus*' (également détecté par clonage). On peut remarquer que la séquence d'ADNr 16S n'est pas discriminante au sein de l'ordre des *Thermococcales* puisque des espèces différentes présentent des similitudes supérieures à 97%. Pour tenter de disposer d'un marqueur plus performant pour la classification des membres des *Thermococcales* entre eux, le région 'ori' (origine de réplication) est un marqueur 'candidat' actuellement à l'étude au laboratoire. Le région 'ori' des deux souches isolées a été séquencé et a permis de confirmer le positionnement phylogénétique de AT1261 près de '*Pyrococcus* MV1079', et de AT1260 dans le groupe de *Thermococcus hydrothermalis* auquel est affilié '*T. sulfurophilus*' (voir arbre *Archaea* en Discussion). '*Pyrococcus* MV1019' et '*Thermococcus sulfurophilus*' sont également des microorganismes isolés de la dorsale médio-Atlantique. '*T. sulfurophilus*' provient même du site Rainbow et est en cours de description sous le nom de '*T. thioeducens*' (Pikuta *et al.* non publié). Par ailleurs, dans le cadre des cultures d'enrichissement en flacon, seules des séquences affiliées à *Thermococcus barophilus* ont été détectées : elles s'avèrent donc différentes de celles obtenues dans le bioréacteur. Les conditions appliquées (90°C, milieu riche, présence de soufre) étaient particulièrement adaptées à la croissance de ce type de microorganismes (hyperthermophiles, hétérotrophes et soufre-réducteurs), toutefois nos résultats ne permettent pas d'estimer la proportion des *Archaea* par rapport aux *Bacteria* au sein de la co-culture en bioréacteur.

Une diversité bactérienne relativement importante a été détectée dans la culture d'enrichissement en bioréacteur. Des séquences affiliées au groupe *Bacillus-Clostridiales* et aux *Thermotogales* ont été détectées à la fois par DGGE et par clonage, et présentent jusqu'à 99% d'identité avec *Caminiella sporogenes* et *Marinitoga piezophila* respectivement. Ces deux microorganismes sont thermophiles modérés, hétérotrophes et capables de réduire le soufre. Ils ont été isolés de sources hydrothermales océaniques (Pacifique oriental et dorsale médio-Atlantique respectivement).

La technique de clonage a permis de détecter en outre des γ -*Proteobacteria*, organismes généralement mésophiles, aérobies et hétérotrophes (2% dans la banque T7), des *Aquificales*, autotrophes et microaérophiles (13% dans la banque T28), mais aussi une quantité importante de séquences affiliées à des microorganismes incultivés appartenant aux ε -*Proteobacteria* (38% dans la banque T7 et 16% dans la banque T28). La physiologie des microorganismes correspondant est de ce fait inconnue. Parmi les espèces d' ε -*Proteobacteria* isolées et décrites à ce jour, aucune ne présente de croissance à des températures supérieures à 70°C, les plus thermophiles d'entre elles appartenant au genre *Caminibacter* (Alain *et al.* 2002b, Voordeckers *et al.* 2005). Les microorganismes repérés dans le bioréacteur étaient donc adaptés à des températures plus élevées que celles décrites jusqu'à présent pour les ε -*Proteobacteria*. La détection de séquences pour lesquelles il n'y a pas de représentant cultivé proche indique que de 'nouveaux' microorganismes étaient également présents dans le bioréacteur.

L'analyse des séquences montre aussi que des membres des espèces *C. sporogenes* et *M. piezophila* auraient été cultivées en fermenteur. Ces espèces sont décrites comme étant thermophiles modérées (température optimale de croissance 55°C-60°C et 65°C respectivement). Il est alors étonnant de les trouver dans une culture d'enrichissement à 90°C, d'autant plus que leur température maximale de croissance, décrite pour les souches pures cultivées en flacon, sont respectivement de 65°C et 70°C. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer le maintien de ces souches à 90°C : (i) les microorganismes présents dans le bioréacteur pourraient appartenir à de nouvelles espèces des genres précités. Ces espèces seraient plus thermophiles et notamment adaptées pour une croissance à 90°C ; (ii) la croissance des souches *Caminicella* sp. et *Marinitoga* sp. détectées dans cette étude pourrait être rendue possible dans des conditions d'hyperthermophilie grâce à des phénomènes de thermotolérance acquise par le biais d'interactions microbiennes (des échanges métaboliques, ou génétiques, etc. favorisant la thermotolérance).

Pour tester l'hypothèse d'échanges génétiques entre les microorganismes présents dans le bioréacteur, une recherche de virus a d'ailleurs été mise en œuvre sur des échantillons provenant de la culture d'enrichissement (réalisé par M. Gaillard, IUEM, Brest). Le protocole utilisé (Geslin *et al.* 2003) a permis l'observation en microscopie électronique à transmission de particules de type viral, de forme filamenteuse. Les virus filamenteux sont connus chez des microorganismes thermophiles du genre *Sulfolobus* : le virus SIFV (*S. islandicus* Filamentous Virus) a par exemple été mis en évidence chez *S. islandicus*, membre des *Crenarchaeota* (Arnold *et al.* 2000). Ce type de morphologie a également été mis en évidence à partir d'échantillons hydrothermaux océaniques, dans des cultures d'enrichissement favorables à la croissance de microorganismes hétérotrophes,

hyperthermophiles, anaérobies et soufre-réducteurs, notamment les *Thermococcales* (Geslin *et al.* 2003). Une observation en épifluorescence, après marquage au SYBR Green, aurait permis de mettre en évidence d'éventuels acides nucléiques au sein de ces particules, ce qui aurait confirmé leur nature virale.

Par ailleurs, plusieurs indices suggèrent l'existence d'une dynamique des populations cultivées au cours de la culture en bioréacteur : la diversité morphologique observée quotidiennement a varié au cours de la culture, des groupes phylogénétiques ont été détectés par DGGE pour des périodes distinctes, et la distribution des séquences au sein des banques de clones était différente à T7 et à T28. On peut supposer que les premiers microorganismes à avoir poussé étaient des espèces de l'ordre des *Thermococcales* induisant une transformation du milieu : réduction du soufre, appauvrissement des substrats initiaux, production de métabolites, etc. De telles modifications du milieu auraient pu générer un contexte favorable à la croissance de bactéries telles que les ϵ -*Proteobacteria* (au métabolisme inconnu) et des microorganismes *a priori* thermophiles modérés.

Les concentrations en sucres, acides aminés et acides organiques ont été déterminées par des analyses HPLC : la consommation des acides aminés était corrélée à la densité cellulaire. Une consommation de pyruvate et une production d'acétate, succinate, acide formique, acide isobutyrique, acide propionique et acide isovalérique ont été observées. Ces acides organiques seraient pour la plupart des produits résultant de la fermentation ou de l'oxydation des acides aminés par les *Thermococcales* (Godfroy *et al.* 1997, Godfroy *et al.* 1996). La production d'acétate, isovalérate et acide isobutyrique a également été montrée au sein du genre *Marinitoga* (Wery *et al.* 2001). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de consommation ou de production caractéristique d'un métabolisme particulier et/ou spécifique à une période donnée.

La présence d'un biofilm qui se serait formé sur les parois du bioréacteur aurait pu servir de 'piège' à des microorganismes de l'inoculum, avant qu'ils ne soient lessivés. La remise en suspension progressive de ces microorganismes dans la culture pourrait expliquer la détection moléculaire, même après 28 jours de culture, de microorganismes qui n'aurait pas poussé. Le dépôt noir qui s'était formé sur les parois du bioréacteur en cours de culture a été prélevé en fin de culture. Après remise en suspension dans de l'eau salée (NaCl 23 g. L⁻¹), il a servi à l'inoculation de milieu F1 en flacon mais aucune croissance cellulaire n'a été observée. Ce dépôt noir a également fait l'objet d'une extraction d'ADN ; toutefois, le protocole utilisé n'a pas permis la mise en évidence d'acides nucléiques. L'examen en microscopie électronique à balayage du dépôt noir n'a pas permis l'observation de cellules. La composition minérale du dépôt a été déterminée : il s'agit principalement de soufre, mais également de zinc, de fer et de nickel, probablement sous forme de sulfures, résultant de la réaction entre l'hydrogène sulfuré et les métaux présents dans le milieu de culture. La

détection de séquences correspondant à des microorganismes inattendus en suspension dans cette culture, à savoir thermophiles modérés et microorganismes incultivés, ne s'explique donc pas par la présence d'un biofilm. De plus, les échantillons de culture prélevés durant les premiers jours (jusqu'à 105 h) n'ont pas permis l'extraction d'acides nucléiques, ce qui laisse penser que les souches détectées ultérieurement (*Bacillus/Clostridiales* et *Marinitoga* sp. à partir de 124 h) correspondent à des souches qui se seraient développées dans le bioréacteur. Par ailleurs, la majorité des phylotypes mis en évidence dans l'échantillon de cheminée (e.g. *Methanococcales*, δ -*Proteobacteria*, cf. Chap. 1) n'a pas été retrouvée dans les séquences issues du bioréacteur ce qui conforte notre dernière hypothèse de travail.

3 Sous-cultures et isolements

Deux souches appartenant à l'ordre des *Thermococcales* ont été isolées avec succès : les échantillons prélevés après 8 et 12 jours de culture ont servi d'inoculum à des sous-culture en flacon sur milieu F1 en présence de soufre et en anaérobiose. Les mêmes conditions de culture ont été utilisées pour la réalisation de 4 séries de dilution successives, qui ont permis d'isoler les souches suivantes : AT1260 correspondant à '*Thermococcus sulfurophilus*', et AT1261 proche de '*Pyrococcus* MV1079'. Ces souches, de part leur absence d'originalité taxonomique et l'existence de souche très proches isolées par ailleurs, n'ont pas fait l'objet d'une description. Néanmoins, ces microorganismes alimentent la collection du laboratoire (Souchothèque de Bretagne), et pourraient présenter des potentialités biotechnologiques (enzymes thermostables).

Nos efforts de sous-culture se sont ensuite portés sur la culture de microorganismes plus originaux, car nouveaux ou inattendus étant données les conditions de la culture. De nombreux essais ont été réalisés pour tenter de sous-cultiver et isoler les bactéries détectées dans la culture d'enrichissement par l'approche moléculaire, en particulier celles affiliées aux ε -*Proteobacteria*, ainsi qu'aux espèces bactériennes thermophiles modérées *C. sporogenes* et *M. piezophila*. Les sous-cultures ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés tout au long de la culture d'enrichissement en fermenteur, et congelés à -20°C en présence de 5% de DMSO. Les échantillons ayant servi d'inoculum ont été choisis en fonction des résultats moléculaires qu'ils ont fournis. Différentes conditions ont été réunies pour réaliser ces cultures.

Tableau 3 : Liste des paramètres qui ont été modifiés pour réaliser des sous-cultures en flacon.

Paramètres	
Température	40, 50, 60, 70, 80 et 90°C
Soufre	Présence ou absence
Phase gazeuse	N ₂ /H ₂ /CO ₂ (90/5/5) H ₂ /CO ₂ (80/20)
Milieux	F1 milieu F1 privé de matière organique (= base minérale et vitaminée) GYPS 2216S *
Milieux particuliers	Utilisation de 4 filtrats obtenues à partir de cultures de <i>Thermococcus</i> sp. (AT1260) et <i>Pyrococcus</i> sp. (AT1261), en phase exponentielle et en phase stationnaire. Chacun de ces filtrats, utilisé à 100% ou en mélange avec le milieu F1 (50/50 v/v), a servi de milieu de culture.
Inoculum	- Différents échantillons de culture prélevés tout au long de la fermentation (dont T7 et T28 analysés par clonage) - Pasteurisation de l'inoculum
Potentiel rédox	Milieux réduits ou non

* milieu généralement employé pour la culture de *Thermococcales* (Godfroy *et al.* 1996).

La stratégie employée a consisté dans un premier temps à appliquer les conditions de la culture en bioréacteur, pour la réalisation des cultures en flacon. Les premiers essais de culture ont donc été réalisés sur milieu F1, à 90°C, en anaérobiose et à pH 6,5. Différentes températures d'incubation ont ensuite été testées : de 40 à 90°C, avec des milieux contenant ou non du soufre. Différents milieux ont également été testés, notamment une série de cultures a été réalisée sur le milieu F1 privé de matière organique en présence d'une phase gazeuse H₂/CO₂, conditions favorables à la croissance de souches autotrophes telles que les *Aquificales* et possiblement les ϵ -*Proteobacteria* détectés dans le bioréacteur. La pasteurisation de l'inoculum avait pour but de sélectionner la croissance des microorganismes sporulant du groupe *Bacillus/Clostridiales* détectés par les méthodes moléculaires. L'abaissement de la température (jusqu'à 40°C), l'utilisation d'un milieu sans soufre, de milieux non réduits et de milieux contenant du sucre (tel que le GYPS) ciblaient la croissance sélective des *Thermotogales* (e.g. *Marinitoga* sp.) par rapport aux *Thermococcales*, hyperthermophiles soufre-réducteurs et anaérobies strictes.

Ces sous-cultures ont été suivies sur environ une semaine, et des prélèvements quotidiens ont permis :

- la réalisation d'observations microscopiques et de comptages éventuels,
- la fixation des échantillons de culture en présence de formaldéhyde (3% final) pour des analyses ultérieures de FISH, et en présence de glutaraldéhyde (0,25% final) pour des analyses ultérieures de cytométrie de flux.

Lorsque des croissances ont été observées, les cellules présentaient dans leur ensemble une morphologie de coque. Quelques bacilles ont été observés, mais correspondaient à une dilution des cellules de l'inoculum, sans présenter de croissance dans les conditions testées.

Les échantillons de culture correspondant à une croissance détectée ont été analysés par cytométrie de flux après marquage des cellules au SYBR Green. L'objectif de cette analyse était la mise en évidence éventuelle de plusieurs populations différenciables par leur morphologie. Ainsi les cellules appartenant au genre *Marinitoga* peuvent avoir une morphologie de coccobacille qui peut facilement être confondue avec celle de coques 'vrais' tels que les *Thermococcales*. Toutefois, cette technique n'a pas permis d'identifier plusieurs populations de coques en fonction de leur morphologie.

Les analyses de FISH ont été réalisées sur des sous-cultures "positives" avec les sondes ARCH915 et EUB338 utilisées en double hybridation. *Pyrococcus abyssi* (souche GE5) et *Marinitoga piezophila* (souche KA3) ont été choisis comme témoins positifs, archéen et bactérien respectivement. Ces analyses ont montré que l'ensemble des coques correspondaient à des *Archaea*. La mise en évidence de *Bacteria* dans les sous-cultures en flacon n'a donc pas été possible.

Les sous-culture n'ayant pas permis de cultiver les bactéries détectées par approche moléculaire, des expériences de RT-PCR ont été mises en œuvre pour rechercher la présence d'ARNr 16S bactériens directement dans les échantillons de culture du bioréacteur, la détection d'ARN constituant un indice de l'activité des cellules détectées, contrairement à la détection d'ADNr 16S. Des culots cellulaires (correspondant à ceux ayant servi au clonage) stockés à -20°C ont fait l'objet d'une extraction des ARN totaux. Une culture pure de *Marinitoga piezophila* (souche KA3) a été utilisée comme témoin positif ; mais il n'a pas été possible de montrer la présence d'ARN bactérien dans les échantillons du bioréacteur. Des ARN archéens ont pourtant été mis en évidence à partir de ces mêmes échantillons. Une culture de *Pyrococcus abyssi* (souche GE5) a alors été utilisée comme témoin positif. Le seuil de détection de la méthode utilisée pourrait constituer une limite pour la mise en évidence des ARN bactériens (la communauté bactérienne représentée peut-être

une fraction moindre de la microflore totale, par rapport aux *Archaea*, dans la culture en bioréacteur).

Les bactéries détectées par leur séquence n'ont finalement pas pu être recultivées en flacon. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : (i) la conservation des échantillons de culture du bioréacteur à -80°C en présence de DMSO (5%) pendant plusieurs mois a probablement induit une perte importante de cellules au moment de la décongélation des échantillons pour inoculer les milieux en flacon. Une conservation des échantillons de culture en anaérobiose à 4°C , sans congélation et sans cryoprotecteur potentiellement toxique pour les cellules, favoriserait probablement le redémarrage d'une croissance plus rapide (ii) le bioréacteur gas-lift pourrait être nécessaire pour recultiver ces souches, les conditions de culture en flacon ne présentent en effet pas de régulation des paramètres physico-chimiques, ni de renouvellement du milieu de culture ; (iii) les bactéries sont peut-être quantitativement trop peu représentées ou trop peu actives dans les conditions de culture testées : le taux de dilution appliqué pour la culture continue en bioréacteur était de $0,04\text{ h}^{-1}$ ce qui autorise en théorie le maintien dans le bioréacteur de microorganismes présentant un taux de croissance supérieur ou égal à $0,04\text{ h}^{-1}$ (i.e temps de génération $\leq 17\text{ h}$). Des bactéries qui auraient une vitesse de croissance proche de la vitesse minimale requise pour ne pas être lessivée seraient alors peu nombreuses et peu actives dans la culture, du fait de conditions de culture peut-être éloignées de leurs conditions optimales, ce qui expliquerait également que leurs ARN n'aient pas été détectés ; (iv) la présence de cultures mixtes est peut-être un élément déterminant pour cultiver les bactéries détectées. Celles-ci auraient peut-être acquis des facteurs de thermoprotection, tels que le 2,3-diphosphoglycérate ou le di-myo-inositol-1,1'-phosphate (Lamosa *et al.* 1998, Scholz *et al.* 1998), produits par des microorganismes hyperthermophiles également présents dans la culture. Une co-culture contenant une souche du genre *Marinitoga* et une souche du genre *Thermococcus* a été rapportée lors de l'isolement de *Marinitoga camini* (Wery *et al.* 2001) : les techniques classiques d'isolement par séries de dilution et isolement sur boîte avaient alors systématiquement échoué, et la souche a finalement pu être isolée en abaissant la température à 40°C et en éliminant le soufre du milieu de culture. N. Wery, dans sa thèse (Wery 2000), émet également l'hypothèse d'un échange possible de facteurs de thermoprotection entre *Thermococcales* et *Thermotogales*.

4 Effet de filtrats de *Thermococcales* sur la thermotolérance de *Marinitoga piezophila* (KA3)

Pour rechercher une explication à la détection de microorganismes *a priori* thermophiles modérés dans la culture d'enrichissement à 90°C, nous avons testé l'hypothèse d'une possible 'thermotolérance' acquise grâce à l'activité des *Thermococcales* présents dans l'enrichissement. Les sous-cultures n'ayant pas permis d'accéder aux bactéries détectées par leur séquence, nous avons choisi de tester l'effet de filtrats de *Thermococcales*, sur la croissance de la souche décrite *Marinitoga piezophila*, dont des séquences proches (99% d'identité des ADN_r16S) ont été détectées dans le bioréacteur.

- Effet du milieu F1 sur la température de croissance de *Marinitoga piezophila*

Les cinétiques de croissance de *M. piezophila* ont d'abord été suivies lors de la croissance de la souche sur le milieu F1 utilisé dans notre étude pour la réalisation des cultures d'enrichissement en continu. Les cultures ont été réalisées en fiole de 20 mL avec trois répétitions pour chacune des températures suivantes : 60, 65, 70, 75, 80, 85 et 90°C.

Alors qu'aucune croissance n'était observée lors de la description de l'optimum de température sur milieu RS (Alain *et al.* 2002a), une faible croissance a été détectée sur milieu F1 à 75 et 80°C. Cependant, l'optimum reste autour de 65°C dans les deux études.

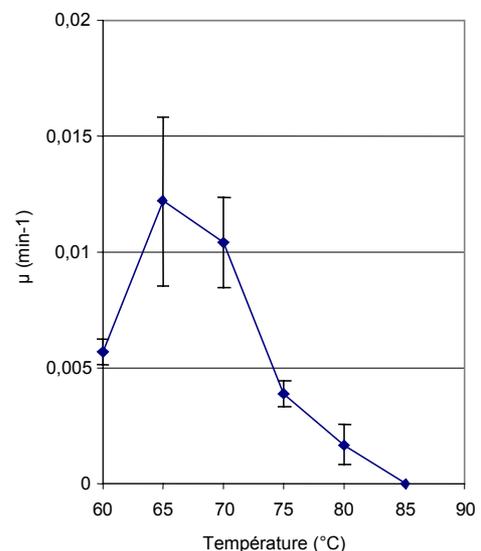


Figure 3 : Vitesses maximales de croissance en fonction de la température, de la souche *M. piezophila* cultivée sur milieu F1.

- Effet de filtrats de cultures de *Thermococcales* sur la croissance de *M. piezophila*

Les deux souches isolées à partir de la culture d'enrichissement en continu à 90°C, *Thermococcus* sp. AT1260 (notée T) et *Pyrococcus* sp. AT1261 (notée P), ont été cultivées sur milieu F1 à 80 et 90°C respectivement. Des filtrats de culture ont été récupérés pour chacune de ces souches en phase exponentielle (notée E) et en phase stationnaire (notée S) par centrifugation de 300 mL de culture puis filtration à 0,22 μm des surnageants. Des mélanges de filtrats et de milieu F1 frais ont été réalisés dans les proportions suivantes : 0/100, 50/50 et 100/0 (v/v). Les 4 filtrats (TE, PE, TS et PS) aux différentes proportions ont été inoculés avec la souche *M. piezophila* et trois répétitions ont été réalisées pour chacune

des températures d'incubation suivantes : 70, 80 et 90°C. Des dénombrements cellulaires ont été réalisés à T1 (+4h) et T2 (+8h) soit la fin de la phase exponentielle et la moitié de ce temps.

Globalement, les densités cellulaires déterminées indiquent une bonne croissance à 70°C, une faible croissance à 80°C, et une absence de croissance à 90°C. Les filtrats TS100 et PS100 donnent des densités maximales plus faibles : ces milieux ayant déjà servi à la croissance de *Thermococcus* sp. AT1260 et *Pyrococcus* sp. AT1261 jusqu'en phase stationnaire sont probablement limitant en matière organique pour permettre l'obtention de fortes densités cellulaires de *M. piezophila*. Les densités cellulaires déterminées à T1 (+4h) semblent indiquer que les filtrats obtenus à partir des cultures de *Thermococcales* en phase exponentielle (TE et PE) stimuleraient la croissance de *M. piezophila*, par une diminution de la phase de latence et/ou par une augmentation de sa vitesse de croissance à 70 et 80°C (température supra-optimale). Ceci suggère une éventuelle thermoprotection conférée par ces filtrats de culture de *Thermococcales*.

Au vu de ces résultats, de nouvelles cultures contenant des filtrats de *Thermococcales* ont été réalisées en flacon pour tenter de cultiver les bactéries *a priori* thermophiles modérées détectées par leur séquences dans le bioréacteur (notamment *Marinitoga* sp.) (voir Tableau 3). Les milieux utilisés étaient les suivants : TE50, PE50, TS50, PS50, TE100, PE100, TS100 et PS100. Une série de ces milieux a été réalisée avec soufre, l'autre sans soufre. Les températures d'incubation étaient 70 et 80°C. Ces cultures n'ont pas permis de recultiver de bactéries à partir d'échantillons du bioréacteur.

Pour poursuivre l'étude physiologique de *M. piezophila*, des expériences supplémentaires ont été envisagées mais n'ont pas été réalisées par manque de temps. Sur des milieux contenant des filtrats de *Thermococcales*, les vitesses maximales de croissance auraient pu être déterminées par réalisation de cinétiques sur chacun des milieux, afin de détecter un éventuel effet stimulant d'un ou plusieurs de ces milieux sur la croissance de *M. piezophila*. Des expériences de culture en flacon ou en bioréacteur auraient également pu être réalisées pour tenter de cultiver *M. piezophila* jusqu'à 90°C, température à laquelle une souche de la même espèce a été détectée dans le bioréacteur, par adaptation progressive de la souche à des températures supra-optimales (65°C → 90°C). Au-delà du test des filtrats de culture, l'effet d'extraits cellulaires de *Thermococcus* sp. et *Pyrococcus* sp. sur la thermotolérance de *M. piezophila* auraient pu être explorés. Des molécules thermoprotectrices pourraient être libérées dans le milieu lors de la lyse cellulaire. On peut encore envisager que la croissance de *Thermotogales* thermophiles modérés (e.g. *M. piezophila*) pourrait être favorisée à des températures supra-optimales lors de cultures mixtes avec des *Thermococcales*.

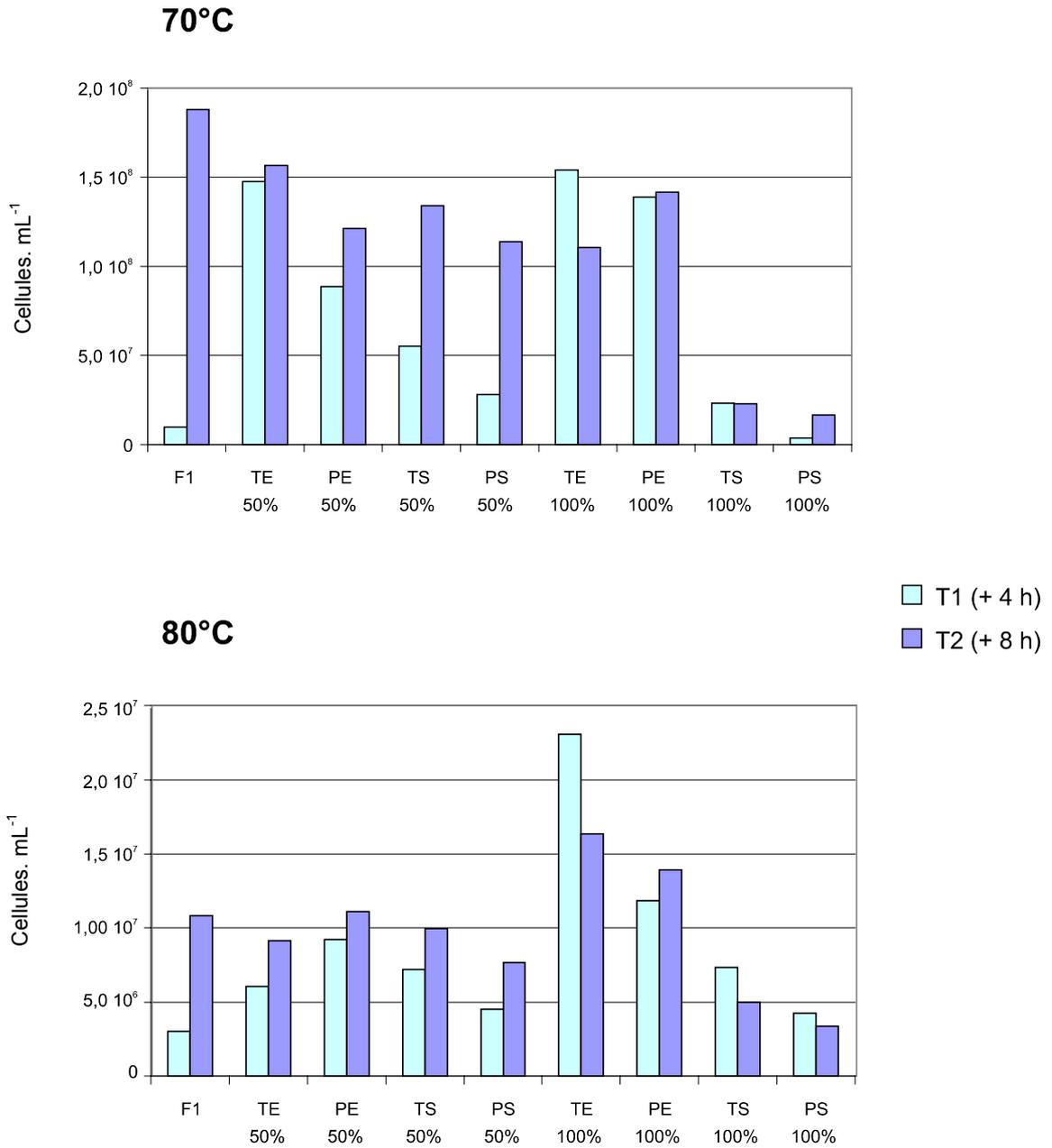


Figure 4 : Densités cellulaires moyennes obtenues à T1 (+ 4 h d'incubation) et T2 (+ 8 h d'incubation) lors de la croissance de *M. piezophila* à 70°C et 80°C sur différents milieux à base de filtrats de cultures de *Thermococcales* (T = *Thermococcus* sp. AT1260, P = *Pyrococcus* sp. AT1261, E = phase exponentielle, S = phase stationnaire). La croissance sur milieu F1 (milieu de la culture d'enrichissement en bioréacteur) sert de témoin.

Chapitre 3

Diversité microbienne obtenue
lors de cultures d'enrichissement
en bioréacteur gas-lift à 60°C

Article soumis (FEMS Microbiology Ecology) :

Postec, A., Lesongeur, L., Pignet, P., Ollivier, B., Querellou, J. & Godfroy, A.
Cultivation of thermophilic microorganisms originating from a hydrothermal black chimney: molecular monitoring of batch and continuous enrichment cultures, and isolation of novel anaerobic thermophiles.

Afin de poursuivre l'exploration des communautés microbiennes cultivables issues du pôle chaud des sources hydrothermales océaniques, de nouvelles cultures d'enrichissement ont été réalisées à 60°C. Après les conditions d'hyperthermophilie testées dans la précédente étude, cette température devrait favoriser la croissance de thermophiles modérés. Hormis le facteur température, les cultures d'enrichissement ont été réalisées dans des conditions similaires à celles décrites précédemment : en continu en bioréacteur gas-lift, et en batch en flacon, sur le milieu complexe F1 en présence de soufre, et en anaérobiose. Différentes techniques moléculaires basées sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S ont été mise en oeuvre pour décrire la diversité microbienne des populations archéennes et bactériennes cultivées à 60°C : DGGE, clonage et FISH. Des échantillons de la culture en bioréacteur ont été prélevés quotidiennement et stockés, outre la congélation, à 4°C en anaérobiose. Ces échantillons nous ont permis de sous-cultiver et isoler plusieurs 'nouveaux' microorganismes enrichis dans le bioréacteur, notamment une nouvelle espèce du genre *Thermosipho* (une autre souche de cette nouvelle espèce est actuellement en cours de description au laboratoire), une nouvelle espèce du genre *Thermodesulfator* (en cours de description au laboratoire), ainsi qu'une nouvelle espèce du genre *Marinitoga*, *M. hydrogenitolerans* sp. nov., dont la caractérisation est décrite dans le chapitre 4.

Cultivation of thermophilic microorganisms originating from a hydrothermal black chimney: molecular monitoring of batch and continuous enrichment cultures, and isolation of novel anaerobic thermophiles.

Anne Postec ^{1*}, Françoise Lesongeur ¹, Patricia Pignet ¹, Bernard Ollivier ², Joël Querellou ¹ and Anne Godfroy ¹.

¹Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France. ²Laboratoire IRD de Microbiologie des Anaérobies, UR 101, Universités de Provence et de la Méditerranée, CESB-ESIL, case 925, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille, France.

* corresponding author: Anne Postec

Mailing address: Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

Tel.: +33-2-98-22-45-53. Fax: +33-2-98-22-47-57. e-mail: Anne.Postec@ifremer.fr

Keywords: deep-sea vent, enrichment cultures, gas-lift bioreactor, microbial diversity, thermophilic, 16S rRNA, isolation

Summary

The microbial diversity of the thermophilic communities inhabiting deep-sea hydrothermal vents was analysed using batch enrichment cultures, in vials, and a continuous enrichment culture, in a gas-lift bioreactor. Experiments were conducted at 60°C and pH 6.5, using a complex medium containing carbohydrates, peptides, and sulfur, and inoculated with a hydrothermal black chimney sample. Cultures were examined by molecular analyses to assess their microbial composition and to evaluate the relevance of both culture methods. Molecular analyses were undertaken through 16S ribosomal RNA (rRNA) gene cloning and sequencing, DGGE, and whole-cell hybridization. Sequences related to the archaeal genus *Thermococcus* and the bacterial genera *Caminiella*, *Marinitoga* and *Thermosipho* were obtained from batch cultures in vials and from the continuous culture in the bioreactor. Interestingly, sequences affiliated to the autotrophic genera *Deferribacter* and *Thermodesulfator* were detected only in the culture in bioreactor, indicating that a larger microbial diversity was observed using this enrichment process. As the presence of novel microorganisms in the bioreactor was supported by phylogenetic information retrieved by molecular techniques, attempts to isolate new strains were undertaken. In this respect, we successfully subcultivated in vials autotrophs belonging to the genera *Deferribacter* and *Thermodesulfator*, and heterotrophs belonging to the genera *Thermococcus*, *Thermosipho* and *Marinitoga*, all originating from the bioreactor. Continuous enrichment culture in a gas-lift bioreactor might be helpful to better assess the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents.

Introduction

It has been established that microbial diversity could be explored by application of molecular biology (Pace *et al.* 1986). In this respect, organisms could be identified without cultivation by retrieving and sequencing macromolecules from nature, many technologies being based on the molecular phylogeny of rRNA sequences. The widespread application of 16S rRNA gene cloning and sequencing methods to identify microorganisms in natural samples has revealed an extensive and, in many cases, unsuspected microbial diversity. Within deep-sea hydrothermal environments, the microbial communities associated with *in situ* colonizers (Alain *et al.* 2004), sediments (López-García 2003), chimneys (Schrenk *et al.* 2003), animals (Alain *et al.* 2002a), or fluids (Huber *et al.* 2003) was reported in recent molecular surveys. The rise of molecular microbial ecology has resulted in new knowledge about microorganisms that have never been cultured. Indeed, Marine *Crenarchaeota* Group I (MGI) (the most abundant and widely distributed *Archaea* in the global ocean biosphere) (DeLong 1992), Deep-sea Hydrothermal Vent *Euryarchaeota* (DHVE) groups I and II (Takai & Horikoshi 1999) and *Korarchaeota* (Barns *et al.* 1994) still remain to be cultivated. Consequently, their physiological features and ecological significance are still unclear.

Beside molecular techniques, classical cultural approaches are necessary to be improved to better assess the microbial diversity of ecosystems as growth conditions routinely used only revealed a small fraction of the global microbial community.

As an alternative to batch cultures in vials, a gas-lift bioreactor was developed to grow anaerobic hyperthermophilic microorganisms (Raven *et al.* 1992). The bioreactor permits a continuous substrate supply, elimination of the volatile metabolic end-products by N₂ sparging, pH and temperature regulation, and incubation for several weeks. It has been used especially to investigate the metabolism of members of the *Thermococcales* including *Pyrococcus abyssi* (Godfroy *et al.* 2000) and to develop minimal media and to optimize the growth conditions of *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus hydrothermalis* (Postec *et al.* 2005a, Raven & Sharp 1997). Beside the study of pure culture, studying enrichment cultures using a gas-lift bioreactor under controlled conditions might be helpful to detect microorganisms poorly represented, exhibiting a long latency phase, or otherwise not previously cultivated. In a previous study (Postec *et al.* 2005b), the gas-lift bioreactor was used to enrich microorganisms from a black smoker collected at a depth of 2275 m on the Rainbow hydrothermal field (Mid-Atlantic Ridge). The 50-day continuous culture was performed at 90°C, on a rich medium containing sulfur under anaerobic conditions. In these conditions, a large microbial diversity was detected, including hyperthermophilic members but also moderately thermophilic members of the orders *Clostridiales* and *Thermotogales*, and members of the epsilon-*Proteobacteria*, that were not retrieved from cultures in vials. In the

present study, the chimney sample previously used (Postec *et al.* 2005) was cultivated using vials and the bioreactor in the same physico-chemical conditions, except that the temperature was lowered to 60°C. This temperature was chosen to have a better insight of the microbial community inhabiting deep-sea hydrothermal vents as moderately thermophilic, thermophilic and hyperthermophilic microorganisms may grow or survive at 60°C. The total microbial community cultivated in vials and in bioreactor was characterized using molecular techniques such as cloning and sequencing of the 16S rRNA genes, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and whole-cell hybridization. Molecular studies were the guidelines for subculturing and successfully isolating novel microorganisms.

Experimental procedures

Samples

During the ATOS cruise (European project VENTOX) on the Rainbow field (36°13'N 33°54'W, 2275 m) located on the Mid-Atlantic Ridge (MAR), an active black smoker was collected by the Remotely Operated Vehicle (ROV) Victor, and brought to the surface in an insulated box in aseptic conditions. On board, eight fragments of the chimney were subsampled according to mineral zonations, from the inner part to the outer part. The subsamples were crushed into an anaerobic chamber (La Calhene, France) and stored in sterile serum vials filled with sterile seawater containing 0.5 mg l⁻¹ of Na₂S. All subsamples were pooled to represent the whole chimney, and used as inoculum at 2%.

Enrichment conditions in bioreactor and culture monitoring

Medium. The growth medium was the modified SME medium (Sharp & Raven 1997) in which yeast and peptone were replaced by: 1 g yeast extract (Difco), 0.5 g casaminoacids (Difco), 0.4 g glucose, 0.4 g dextrin (from corn), 0.2 g galactose, 0.2 g dextran, 0.1 g glycogen, 0.2 g pyruvate, 0.1 g acetate, (all purchased from Sigma). The medium was supplemented with 3 g l⁻¹ colloidal sulfur.

Culture conditions. The medium was sterilized by filtration (Sartoban, 0.22 µm) in a 20 l Nalgene bottle containing the colloidal sulfur, previously sterilized by heating twice at 100°C for 30 min on two successive days. The culture was performed at 60°C and pH 6.5 in the 2-liter gas-lift bioreactor as previously described (Godfroy, *et al.* 2000, Postec, *et al.* 2005a, Raven, *et al.* 1992, Raven & Sharp 1997). Temperature was controlled by a heated circulating bath filled with water, and temperature was monitored with a standard PT100 probe covered with Teflon. The pH was monitored using a combination gel pH electrode

(Pettler Toledo); acid (1N HCl) and base (1N NaOH) were added with two peristaltic pumps (Masterflex). Temperature and pH were controlled with a 4-20 mA controller and AFS Biocommand system from New Brunswick (Nijmegen, Netherlands). Fresh medium addition and sample withdrawal were performed using peristaltic pumps (Masterflex). The culture was sparged with N₂ (0.1 v. v⁻¹. min⁻¹) to maintain anaerobic conditions, and to eliminate possible volatile metabolic end products that might inhibit the growth of microorganisms. The bioreactor was maintained as a batch culture for the first 34 h to prevent wash-out of cells before they had a chance to multiply. After 34 h (i.e. day 1 = T1), fresh medium was provided by applying a dilution rate of 0.04 h⁻¹ (80 ml h⁻¹). To test the effect of the temperature on the composition of the cultivated microbial community, the temperature was increased from 60°C to 70°C at T31 (day 31) and to 80°C at T36 (day 36).

Culture monitoring. The culture was maintained for 45 days. Culture samples from the bioreactor were collected every 24 hours, from T0 to T45, representing a total of 46 samples. Cell concentration was determined every day by direct cell counting, using a Thoma chamber (0.02 mm depth) viewed with an Olympus BX60 phase contrast microscope (×400).

Sample preservation. For each sampling, 10 ml of culture were preserved anaerobically at 4°C in a serum vial, and eight cryotubes with 1.8 ml of culture were frozen at -20°C with 5% DMSO (v/v). Cells were also recovered for DNA extraction from 15 ml of culture by centrifugation (30 min at 8000 g). Cell pellets were washed with 23 g l⁻¹ sterile NaCl, added with 5 ml of lysis buffer TE Na 1X (Tris-HCl pH 8, 100 mM ; NaCl, 100 mM, EDTA pH 8, 50 mM), and stored at -20°C until the DNA extraction procedure was undertaken. For hybridization analyses, 12 ml of culture sample were fixed for two hours with 3% (v/v) formaldehyde. Fixed cells were recovered by centrifugation (10 min at 6000 rpm), then rinsed with PBS buffer (phosphate-buffered: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄, per liter of distilled water, pH 7.4) before storage in 50% (v/v) ethanol in PBS at -20°C. For HPLC analyses, 1.5 ml of culture sample was centrifuged (10 min at 10000 rpm) and the supernatant recovered was stored at 4°C until analysis.

Enrichment conditions in vial and culture monitoring.

Cultures were performed anaerobically in 100 ml serum vials (Godfroy, *et al.* 1996), using the same medium employed for the enrichment culture in the bioreactor, to which 6.05 g l⁻¹ PIPES was added and colloidal sulfur was replaced by 10 g l⁻¹ sulfur powder. The same temperature (60°C) and pH (pH 6.5) as in the bioreactor were used. Cell pellets dedicated to DNA extractions were recovered from 15 ml of culture, after 24 h (sample A1) and 41 h (sample A2) of incubation. The first 24 h culture (A1) was subcultured for 17 h in vial in the same conditions (sample B).

Nucleic acid extraction.

DNA was extracted from frozen cell pellets in lysis buffer (cells recovered from 15 ml of culture, see procedure above). A modified version of the protocol described by Alain *et al.* (Alain, *et al.* 2002a) was followed combining chemical and enzymatic lysis. For these culture samples, the applied lysis treatment was 1.5 h and 2.5 h. Afterwards, intact cells could not be observed by microscopy. Supernatants from the 1.5 h and 2.5 h lysis were pooled and extracted twice with equal volumes of buffered (pH 8.0) PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol : 25/24/1), once with an equal volume of chloroform and DNA was finally precipitated by addition of 70 % (v/v) isopropanol. After centrifugation at 11000×g for 30 min, DNA was air dried before being resuspended in 250 µl TE-1× buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.5). The extracted DNA quality was routinely checked using 0.8% agarose-TAE-1× gels.

Amplification of the 16S rRNA gene and DGGE analysis.

The variable v3 region of 16S rRNA genes from extracted DNA were amplified using primers specific to the bacterial domain, using the primers 341F-GC and 907R (Muyzer *et al.* 1993, Muyzer & Smalla 1998). The PCR procedure and the analysis of the fragments by DGGE using Bio-Rad Dcode apparatus are described in Muyzer *et al.* (Muyzer, *et al.* 1993). Electrophoresis conditions, gel staining, DGGE band extraction, DNA reamplification, and PCR product purification were performed using the conditions described by (Postec, *et al.* 2005b).

Amplification of the 16S rRNA gene and cloning.

Archaeal DNA was amplified using the primer A24F (5'-TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA-3') and the reverse primer 1407R (5'-GAC GGG CGG TGW GTR CAA-3') or alternatively A23SR (5'-CTT TCG GTC GCC CCT ACT-3', position 257-234 on *Thermococcus celer* 23S rDNA sequence). Bacterial DNA was amplified using primer E8F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') and the reverse primer U1492R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'). PCR reactions were performed on a Robocycler Gradient 96 (Stratagene) (Nercessian, *et al.* 2003, Wery *et al.* 2002). PCR products were then checked on a 0.8% (w/v) agarose gel and directly cloned using the TOPO TA Cloning[®] kit (pCR2.1 vector), according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Clone libraries were constructed by transforming *E. coli* TOP10F' cells. An archaeal and a bacterial library were constructed from two culture samples from the enrichment culture in bioreactor named T7 and T28, collected respectively after 7 and 28 days of culture. An archaeal and a bacterial library were constructed from each sample of enrichment cultures in vials (A1, A2 and B).

16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis.

DNA fragments obtained by DGGE were sequenced by Genome Express S.A. (Grenoble, France). From clone libraries, each clone was cultivated overnight at 37°C with shaking (320 rpm) on deepwell microplates, in 1 ml Luria Bertani broth 2X medium containing ampicillin (50 µg ml⁻¹). Plasmids were extracted and purified using Montage Plasmid Miniprep₉₆ Kits (Millipore) and partially sequenced using BigDye Terminator chemistry, with an automated capillary sequencer (Applied Biosystem). Sequences were compared to those available in databases, using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) network service (Altschul *et al.* 1990) in order to determine phylogenetic affiliations and detect chimeric sequences. Alignment of 16S rDNA sequences were performed using the CLUSTALW program (Thompson *et al.* 1994), then refined manually using the SEAVIEW program (Galtier 1996). Sequences displaying more than 97% similarity were considered to be related, and grouped in the same phylotype. Complete 16S rDNA sequences were obtained for the representative clone of each unique phylotype : the related partial sequences were first assembled using the SEQMAN module of the DNASTAR software (Madison, WI, USA), and the complete sequences were analysed with the BLAST program.

Whole-cell hybridization

Fixed cells in PBS/ethanol 50% (v/v) (fixation procedure described above) were diluted if necessary and filtered on a 0.2-µm-pore-size white polycarbonate filter (Isopore Membrane Filters, Millipore) laying on a nitrocellulose membrane. After drying at room temperature, cells were hybridized with the archaeal universal probe ARCH915 (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') labelled with indocarbocyanin (Cy3) (Eurogentec) and with the universal bacterial probe EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') labelled with fluorescein-isothiocyanate (FITC) (Eurogentec). Whole-cell hybridization were carried out at 46°C after addition of 1.5 µl ARCH915 and 1.5 µl EUB338 each at 50 ng µl⁻¹ and 12 µl hybridization solution [NaCl 5 M: 360 µl, Tris-HCl 1 M pH 7.4: 200 µl, formamide: 400 µl, sodium dodecyl sulfate (SDS) 10%: 1 µl, deionized water: 1039 µl] onto each filter. After 2 h hybridization, the filters were rinsed up 15 min at 48°C in a wash solution (NaCl 5M: 1.8 ml, Tris-HCl 1 M pH 7.4: 5 ml, SDS 10%: 25 µl, deionized water: 43.2 ml). After the hybridization procedure, each sample was stained with 10 µl of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI 1 µg ml⁻¹). After addition of Citifluor (Citifluor, UK) on the filters, the hybridized cells were viewed with an Olympus microscope (BX60) equipped with a UV lamp and filters for DAPI (excitation 365 nm, emission 397 nm), FITC (excitation 492 nm, emission 520 nm), or Cy3 (excitation 550 nm, emission 570 nm).

Analyses of amino acids, organic acids, and aromatic acids.

The HPLC procedure used for analyses of amino acids, organic acids and carbohydrates is in (Wery, *et al.* 2001).

Gas analyses

The gas outflow from the bioreactor was directly analysed using a MTI M200D microgas chromatograph equipped with a thermal conductivity detector. A Molecular Sieve column with argon as the carrier gas and a temperature of 30°C were used to detect H₂. CO₂ and H₂S were detected with a Poraplot U column at 100°C, with helium as the carrier gas.

Subcultures and isolations

The media employed for the subcultures were designed to cultivate heterotrophic as well as autotrophic microorganisms that might be expected to grow with different electron acceptors (sulfur, nitrate, sulfate). Isolation of strains whose phylotype were recovered in the clone libraries were attempted from the enrichment culture samples T7 and T28 issued from the bioreactor. Four culture media were used. The enrichment medium was used as described above, and also used according to the three following modifications. Vitamins and minerals were preserved and organic substrates were replaced by: (1) NH₄Cl 0.03 g l⁻¹, acetate 0.016 g l⁻¹, yeast extract 0.01 g l⁻¹, and sulfur 5 g l⁻¹ in the DS medium, or (2) NaNO₃ 0.2 g l⁻¹ in the DN medium, or (3) Na₂SO₄ 0.3 g l⁻¹ in the T medium. The DS, DN and T media were adjusted at pH 6.5. The DS medium was sterilized by tyndallisation (twice 30 min at 100°C) while the DN and T media were autoclaved (20 min at 121°C). In the anaerobic chamber, the media were reduced with Na₂S (final concentration: 0.05 g l⁻¹), then aliquoted into Hungate tubes or penicillin vials under N₂/H₂/CO₂ (90:5:5). The gas phase was then replaced performing 10 cycles of vacuum extraction / addition of H₂/CO₂ (80/20, v/v, 2 bar). All the incubations were performed at 60°C.

Nucleotide sequence accession numbers

The sequence data used in this study have been submitted to the EMBL databases under accession number AJ874300 to AJ874328.

Results

Monitoring of the enrichment culture in bioreactor

The bioreactor was inoculated at 2% (v/v) with a chimney sample suspension. Starting from $2.7 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹ at T0, cell density reached $7.4 \cdot 10^8$ cell ml⁻¹ at T2 and its maximal value $2.2 \cdot 10^9$ cell ml⁻¹ at T31 (Fig. 1). Amongst observed morphologies, coccoid cells, single or in pairs, were dominant at T2. After T2, rods displaying various morphologies became widely dominant. Short, rod-shaped cells appeared singly or in chains within an outer sheath-like structure, comparable to the toga specific to *Thermotogales* (Urios *et al.* 2004). Short rods could be motile. Long rods exhibiting a terminal endospore were observed. From T27, coccoid cells single or in pairs, increased in density compared to the rod morphologies. At the end of the culture, rod morphologies had nearly disappeared.

Metabolism products from the continuous culture analysed by HPLC and gas chromatography

H₂S production was detected using Zn acetate strips (Lead Acetate, Whatman) from T2 until the end of the culture. H₂, CO₂ and H₂S could be detected in T8, T21, T30 and T38 samples by gas chromatography. From T3 until T41, HPLC analysis of the free amino acids in the culture medium showed that they were all completely consumed, and might be therefore brought in limiting concentrations. Analysis of the carbohydrates and organic acids by HPLC showed that glucose was also completely consumed from T4 to T32, and then could be detected again indicating a lowered consumption. Pyruvate, present in the fresh medium and also known to be a metabolic product, was not detected in samples from T16 to T27.

16S rDNA libraries from the enrichment culture in bioreactor

Archaeal and bacterial 16S rRNA genes were successfully amplified from T7 and T28 culture samples from the continuous enrichment culture in bioreactor. All the archaeal sequences from T7 and T28 were related to the genus *Thermococcus* (Table 1). The sequence types A704 and A800 were affiliated to *T. siculi*, and shared more than 97% of identity with a large number of 16S rDNA sequences related to members of the group *T. siculi* - *T. celer*, according to the BLAST analysis. Bacterial sequences affiliated with the orders *Clostridiales*, *Thermotogales* and *Deferribacterales* were retrieved in both T7 and T28 libraries (Table 1, Fig. 2), and were closely related to the hydrothermal microorganisms *Caminiella sporogenes* (Alain *et al.* 2002b) (97% identity with clones 775 and 813), *Marinitoga camini* (Wery *et al.* 2001) (94% identity with the clone 716, 95% with clone 805) and *Deferribacter abyssi* (Miroshnichenko *et al.* 2003b) (97% identity with clones 737 and 820), respectively. The proportion of clones related to *Deferribacter* and *Marinitoga* increased slightly at T28,

while the number of clones related to *Caminicella* decreased from 50% to 7%. Only two phlotypes were recovered in the T28 bacterial library: (i) 12 clones were closely related to *Thermosipho* MV1063; the sequence type 840 shared 99% identity with this strain and the closest relative species was *T. melanesiensis* (96% identity) and (ii) 3 clones were affiliated to the genus *Thermodesulfatator* and the sequence type 850 shared 96% identity with *T. indicus*.

DGGE and whole-cell hybridization analysis from the enrichment culture in bioreactor

As bacterial diversity was detected in the enrichment culture in the bioreactor by examining the clone distribution among T7 and T28 libraries, it was further investigated with DGGE analysis. The v3 hypervariable region of the bacterial 16S rDNA could be amplified using DGGE primers from the following culture samples: T1, T4, T9, T13, T16, T24, T28, T31 and T36. No amplification could be obtained from samples collected after T36, probably due to the low cell density ($1.8 \cdot 10^7$ cell ml⁻¹ at T41). Representative DGGE bands corresponding to various samples and displaying different migration distances were extracted from gels (not shown) and could be successfully re-amplified directly with the DGGE primers used previously. Sequences retrieved from representative bands were affiliated with phylogenetic groups yet represented in the T7 and T28 bacterial clone libraries (Table 1). DGGE bands corresponding to sequence types (approximately 500 pb) closely related to the strain *Thermosipho* MV1063 (99% identity) were obtained from T1 to T36 samples, *Marinitoga camini* (96%) was obtained from T31 sample, *Caminicella sporogenes* (99-98%) were obtained from T4 to T31 samples, and *Deferribacter abyssi* (87%) were obtained from T1 to T31 samples (Table 2). The relative proportions of archaeal and bacterial cells were determined in eleven culture samples of the bioreactor, from T2 to T41 (Fig. 1). Approximately 2000 cells were counted on filter for each sample. 99.0% of the cells detected at T2 belonged to the *Archaea*; *Bacteria* were dominant from T4 to T31 (between 94.8 to 99.8% until T24, then 60.0% at T28 and 54.6% at T31) (Fig. 3). At T36 and T41, *Archaea* became predominant again, representing 61.6% of the cells at T36 and 98.8% of the cells at T41. Temperature increased to 70°C at T31 and to 80°C at T36 and was associated with a significant decrease in the cell density ($2.2 \cdot 10^9$ cell ml⁻¹ at T31 and $1.8 \cdot 10^7$ cell ml⁻¹ at T41).

16S rDNA libraries from the enrichment cultures in vials

Total DNA was successfully extracted from A1, A2 and B culture samples. Archaeal 16S rDNA could be amplified by PCR only from sample A1, corresponding to the primary enrichment culture after 24 h of incubation. No archaeal 16S rDNA sequences could be amplified neither after 41 h of culture (A2), nor after subculturing from A1 (B). All 55 archaeal clones from the A1 library were related to the genus *Thermococcus* (Table 3). The sequence

type A254 displayed 97 % identity with the closest described strain *T. barophilus* (AY099172), also originating from the Mid-Atlantic Ridge (Snake Pit) (Marteinsson *et al.* 1999) and growing at 48-95°C under atmospheric pressure. Bacterial 16S rDNA could be amplified by PCR from the three samples (A1, A2 and B). Sequences related to the species *Marinitoga camini* and *Caminicella sporogenes* were retrieved in each library. Sequences related to the strain *Thermosipho* MV1063 were not recovered in the primary culture (A1), but only after 41 hours of incubation (A2) and after a 17 h subculture (B). Moreover, a shift in the library compositions could be observed, since sequences related to *M. camini* were widely dominant in the A1 library, whereas sequences related to *C. sporogenes* became widely dominant in the A2 and B libraries (Fig. 2). Extending the incubation time or subculturing from the primary A1 culture resulted in similar changes in the composition of the bacterial libraries.

Subcultures and isolations

Isolation of microorganisms from the bioreactor was attempted using cultures in vials taking into account the physico-chemical conditions within the continuous culture, i.e. at 60°C and pH6, on the medium described for enrichment culture in vials, and under anaerobic conditions (N₂/H₂/CO₂: 90/5/5). Repeated dilutions-to-extinction cultures, followed by streaking on solidified enrichment medium, were performed from the T7 culture sample. Cells observed were weakly motile rods, surrounded by a “toga”, an outer sheath-like structure. A strain, referenced as AT1271^T, was isolated and identified as a new member of the *Marinitoga* genus, among the bacterial order *Thermotogales*, and named as ‘*M. hydrogenitolerans*’ (Postec *et al.* 2005).

Using the same procedure, one strain belonging to the genus *Thermococcus* was isolated from the T3 sample by repeated dilution-to-extinction cultures. The isolate was referenced as AT1273. Its 16S rDNA sequence shared 99% identity with *Thermococcus siculi*. Its 16S rDNA sequence was also aligned with the sequence types A704 and A800 issued from the continuous culture, and shared more than 98% of similarity with each one.

By streaking on solidified enrichment medium, an isolate closely related to *Thermosipho* MV 1063 was obtained. Its 16S rDNA sequence shared 98% identity with *Thermosipho* MV1063 and 95% with the closest described species *T. melanesiensis*. This *Thermosipho* strain was referenced as AT1272.

Sequences related to the genera *Thermodesulfator* and *Deferribacter* were retrieved from the T28 bacterial clone library. Isolation of the corresponding strains was attempted from culture samples collected at T28. Positive growths were obtained at 60°C under H₂/CO₂ (80/20) on the T medium. Several successive subcultures were grown successfully on the same T medium. The microbial population was mainly composed of small motile rods (0.5 - 1

µm) occurring singly or in pairs, and occasionally elongated, mixed with *Thermotogales*-like cells. The detection of H₂S in the gas phase of a medium containing sulfate and lacking sulfur as electron acceptor strongly suggests the growth of a sulfate-reducing microorganism. A partial 16S rDNA sequence was obtained from this culture and shared 96% of similarity with the one of *Thermodesulfatator indicus*.

Positive cultures were also obtained on the medium DS containing sulfur. The culture was successfully subcultured several times on the DS medium, and then several times on the DN medium depleted in sulfur and containing NO₃⁻ as terminal electron acceptor. The morphologies observed included few cocci and dominant motile, straight- to vibrio-shaped organisms, detected in both media. Two strains were identified by 16S rDNA sequencing and were affiliated to the hydrothermal species *Deferribacter abyssi* (Miroshnichenko, *et al.* 2003b) (99% of identity) probably corresponding to the rod-vibrio shaped cells, mixed with a *Thermococcus* sp. strain probably corresponding to the coccoid cells.

Discussion

To access the cultivable microbial community inhabiting a hydrothermal black smoker, enrichment cultures were performed in a bioreactor and in batch vials at 60°C and pH 6.5. Molecular techniques based on the 16S rRNA gene gave snapshot images of the microbial diversity examining the clone libraries and regular data on the microbial community structure through the use of DGGE and whole-cell hybridization.

Biases inherent to molecular techniques must be kept in mind. However, the molecular monitoring of the continuous culture in bioreactor showed that sequences closely related to *Thermosipho* MV1063 could be detected by DGGE at T7 and were not retrieved by the cloning method. Moreover, 29 and 35 16S rDNA sequences related to *Marinitoga camini* were recovered respectively from the T7 and T28 clone libraries, and the corresponding strain could be isolated from T7. However, only one sequence related to *M. camini* could be detected by the DGGE analysis from the T31 sample. Also, no DGGE sequence related to *Thermodesulfatator* was detected. The use of different molecular methods is therefore complementary. The possible limitations of primer selectivity and cloning biases (Theron & Cloete 2000) or PCR biases (Suzuki & Giovannoni 1996) are well established and can explain the differences between results issued from various methods. Indeed, clone abundance in a library does not necessarily represent the rDNA sequence abundance in the corresponding nucleic acid extracts. Yet molecular methods generally do detect the numerically dominant phylotype (Head *et al.* 1998).

Before discussing the results of molecular analysis and subcultures/isolations in vials from culture samples of the bioreactor, it should be noted that the dilution rate applied after 34 h of

batch culture was 0.04 h^{-1} and corresponded to a generation time of 17.25 h. Although the continuous culture involves a progressive dilution of the medium inside the bioreactor, a total renewal of the culture medium after 4 volume changes, i.e. 100 h (about 4 days), was considered sufficient to completely renew the culture medium in the bioreactor with a dilution rate of 0.04 h^{-1} (Raven, *et al.* 1992). Thus, microorganisms thriving in the continuous culture from T6 were not washed-out and should have grown with a maximal generation time of 17.25 h.

Archaeal diversity

From the enrichment cultures in vials, archaeal 16S rDNA could be amplified only from the A1 culture sample (collected after 24 h of incubation), permitting the construction of an archaeal clone library. Also, no *Archaea* could be detected in A2 (48 h of incubation) and in B (subculture from A1) using the ARCH915 probe in the whole-cell hybridization analysis. For the continuous enrichment culture, results of hybridization analysis showed that *Archaea* represented 99% of the cells at T2, then fell at or under 5.2% from T4 to T24. Archaeal sequences of the A1, T7 and T28 libraries were all related to the genus *Thermococcus* and a strain thriving in the continuous culture was isolated from the T3 sample. Its closest described relative was *T. siculi* (Grote *et al.* 1999). Although all the members of the *Thermococcales* are hyperthermophilic, their early growth both in the bioreactor and in vials is possible since (i) some described species among *Thermococcus* are able to grow at 60°C (Godfroy *et al.* 1997), (ii) an absence of latency phase could explain the early growth (*T. hydrothermalis*; Godfroy, pers. com.), (iii) the number of *Thermococcus*-related cells might be abundant in the chimney sample used as inoculum. Molecular inventory of the crude chimney showed that sequences related to *Thermococcus* could be detected, unlike sequences related to the bacterial strains cultivated in the present study (Cambon-Bonavita, unpublished).

The concentration of the *Thermococcus*-related cells increased significantly at T28 [40% of the microbial community according to the hybridization analysis (Fig. 1)], which indicates a dynamics among the structure of the cultivated populations rather than the establishment of a stable stationary state.

Our two experimental approaches led to a different insight within the archaeal diversity. We observed that *Thermococcus*-related phylotypes retrieved from enrichment cultures in bioreactor at 60°C (this study) and 90°C (Postec, *et al.* 2005b) were affiliated to the group *T. celer* – *T. siculi*, whereas *Thermococcus*-related phylotypes retrieved from enrichment cultures in vials in comparable conditions were affiliated to the more-deeply branched group of *T. barophilus*. The strain AT1273 closely related to *Thermococcus siculi* was isolated from the enrichment culture in bioreactor at 60°C , and grew optimally at 80°C (determination of

the optimal growth temperature: not shown). No moderately thermophilic or thermophilic *Archaea* were reported neither in this study; neither in the literature: except *Methanothermococcus okinawensis* that grows optimally at 60-65°C (Takai *et al.*, 2002), all the described archaeal species originating from deep-sea hydrothermal environments grow optimally in pure culture at or above 75°C. This suggests that most *Archaea* thriving in deep-sea hydrothermal chimneys are hyperthermophilic.

Members of *Thermococcales* at deep-sea hydrothermal vents are widespread (Harmsen *et al.* 1997, Nercessian *et al.* 2003, Reysenbach *et al.* 2000, Takai *et al.* 2001), and members of the genus *Thermococcus* are some of the most numerous described hyperthermophiles from deep-sea vents. They have been isolated from sulfidic chimneys (Godfroy *et al.* 1996), sediments (Canganella *et al.* 1998), fluids (Grote, *et al.* 1999) and polychaete worms (Pledger & Baross 1991). Investigation of their natural distribution showed that a viable *Thermococcus* population was present in the surface layers of hydrothermal chimneys (Harmsen, *et al.* 1997, Schrenk, *et al.* 2003, Takai, *et al.* 2001). Interestingly, members of *Thermococcales* were not detected in molecular diversity analyses of hydrothermal deposits, fluids or *in situ* colonizers deployed at low temperatures (Alain, *et al.* 2004, Huber *et al.* 2002, Takai & Horikoshi 1999). However *Thermococcus* was detected in *in situ* colonizers deployed in thermophilic conditions (Corre 2000, Nercessian, *et al.* 2003, Reysenbach, *et al.* 2000). These organisms should therefore be efficient surface colonizers. Furthermore, *Thermococcus* populations were observed early in the enrichment cultures performed in vials or bioreactor, at 60°C (this study) and 90°C (Postec, *et al.* 2005b). An early growth may confer on *Thermococcus* microorganisms a great ecological advantage to colonize a new hydrothermal environment. It may indicate that *Thermococcus* members are the primary heterotroph colonizers. This is consistent with the observations and hypothesis emitted by Nercessian *et al.* (2003), who showed that the proportion of *Thermococcales*-related phylotypes was higher from the shortest deployments (4-7 days) of *in situ* collectors than in longer deployments. These results differ from observations and hypothesis as reported by Reysenbach *et al.* (2000) suggesting that chemolithoautotrophs would be the first colonizers of vent surfaces and that thermophilic heterotrophs such *Thermococcales* would emerge after a sufficient organic carbon accumulation.

Bacterial diversity

All the sequences retrieved in our enrichment cultures were related to cultivated microorganisms originating from deep-sea hydrothermal vents. Members of the genera *Caminiella* and *Marinitoga* were detected in the enrichment cultures performed in vials and in the bioreactor, whatever the incubation time or the occurrence of subculturing, suggesting

that the related microorganisms are particularly well adapted to the culture conditions. Sequences of autotrophic bacteria related to *Deferribacter* and *Thermodesulfatator* could be detected only in the continuous culture in bioreactor at T28, and were subsequently successfully subcultivated. This confirmed the advantage of the enrichment by continuous culture in bioreactor rather than in vials since a wider diversity was revealed.

Although bacterial sequences were related to moderately thermophilic microorganisms, growth of *Archaea* belonging to the hyperthermophilic genus *Thermococcus* occurred in a first time despite the temperature of 60°C. We deduced that 99% of the cells thriving in the continuous culture at T2 were related to *Thermococcus*. Their metabolism through sulphur reduction might have generated a propitious environment for the successive growth of bacterial species: the heterotrophic strains *Caminicella* spp., *Thermosipho* spp. and *Marinitoga* spp., and the autotrophic strains *Deferribacter* spp. and *Thermodesulfatator* spp.. Sequences related to autotrophic microorganisms could be detected in the T28 library, but not in the T7 one. Interestingly, Nercessian *et al.* (2003) showed similarly that the proportion of *Thermococcales*-related phylotypes decreased in longer deployments of *in situ* collectors in hydrothermal environments, whereas previously undetected phylotypes and those related to facultative and/or strict chemolithoautotrophs increased or emerged.

Among heterotrophic bacteria evidenced in this study, a sequence related to *Caminicella sporogenes* was detected both in the cultures in vials and in the bioreactor. *C. sporogenes* is a thermophilic bacterium belonging to the *Clostridiales* and isolated from the East Pacific Rise (EPR) hydrothermal vent (Alain, *et al.* 2002b). This study showed the occurrence of members of this species on the Mid-Atlantic Ridge. Among the order *Thermotogales*, two strains were isolated from the enrichment culture in bioreactor and corresponded to the phylotypes evidenced by molecular analyses. Strain sp. AT1272 belonged to the genus *Thermosipho*. Its 16S rDNA sequence shared 96% similarity with *T. melanesiensis* and 99% with *Thermosipho* strain MV1063, both originating from the Mid-Atlantic Ridge. Strain AT1271^T belonged to the genus *Marinitoga*. Its 16S rDNA sequence shared 96% of similarity with the closest relative *M. camini*. This strain named '*M. hydrogenitolerans*' was recently characterized (Postec, *et al.* 2005). Its growth was not affected by the high hydrogen concentration in the culture headspace, and this constitutes its main distinctive feature among the *Marinitoga* spp. This tolerance could result from adaptation of strain AT1271^T to the high hydrogen concentrations (16 mmol kg⁻¹) measured in all vent fluids at the Rainbow field from which strain AT1271^T was recovered (Charlou *et al.* 2002).

Among autotrophic microorganisms co-cultivated with heterotrophs in the bioreactor, a new strain belonged to the genus *Thermodesulfatator*, order *Thermodesulfobacteriales*. This genus is represented so far by the unique species *T. indicus* (Moussard *et al.* 2004), a

thermophilic, anaerobic and strictly chemolithoautotrophic bacterium growing exclusively with CO₂ as sole carbon source, H₂ as sole electron donor and sulfate as sole electron acceptor. A second autotrophic strain identified from the continuous culture was affiliated to *Deferribacter abyssi* (Miroshnichenko, *et al.* 2003b) and shared 99% similarity based on the 16S rDNA sequence. *D. abyssi* is a thermophilic, anaerobic and facultative chemolithoautotrophic, isolated from an *in situ* growth chamber (Reysenbach, *et al.* 2000) incubated for 2 days on Rainbow which used elemental sulfur or nitrate as electron acceptors, similarly to the strain retrieved from the bioreactor.

Here in our experiment conducted under continuous culture, heterotrophs and chemolithotrophs were co-cultivated in the continuous enrichment culture. The former most probably used organic carbon provided by the continuous medium supply, whereas the latter utilized hydrogen as electron donor and carbon dioxide as carbon source, both compounds being end-products of the metabolism of fermentative microorganisms. This co-culture *in vitro* represents a thermophilic fraction of the microbial diversity inhabiting the black smoker. In the hydrothermal ecosystem, we may expect that chemolithoautotrophs should use the geochemical energy associated with the mixed hydrothermal fluid, while heterotrophs might utilize the organic carbon available at hydrothermal vent environments resulting from the high productivity of micro- and macroorganisms (Giere *et al.*, 2003).

Insight into microbial diversity at the Rainbow field

O'Brien *et al.* (1998) first published data on the microbiology at the Rainbow hydrothermal site. From biomass collected by filtration, the authors determined by FISH analysis that the proportion of *Archaea* was higher in the plume than in the surrounding seawater. In further molecular studies, the microbial diversity of two black smokers of the Rainbow field, including the chimney used in the present study, have been investigated through cloning and sequencing of the 16S rRNA genes (Cambon-Bonavita, unpublished).

In addition to '*Marinitoga hydrogenitolerans*', other new microorganisms were isolated very recently from hydrothermal samples of the Rainbow site. A new archaeal species related to the genus *Thermococcus* has been isolated and named '*T. thioreducers*' (Pikuta *et al.* non publié, 2004). To our knowledge, all the described new species originating from Rainbow are thermophilic *Bacteria*. *Vulcanithermus mediatlanticus* (Miroshnichenko *et al.* 2003a) is a facultative chemolithoheterotroph using oxygen or nitrate as electron acceptors and molecular hydrogen as the energy source. *Caminibacter profundus* grows with H₂ as energy source, sulfur, nitrate or oxygen as electron acceptors and CO₂ as carbon source (Miroshnichenko *et al.* 2004). *Caminibacter mediatlanticus* is strictly anaerobic, and grows in the presence of H₂ and CO₂ with nitrate or sulfur as electron acceptor (Voordeckers *et al.* sous presse, 2005). *Deferribacter abyssi*, whose type strain JR^T was isolated from the

Rainbow field, was also detected in this study. In addition, sequences related to the phylum *Deferribacteres* were recovered from the gut of a hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata* collected on the Rainbow field (Zbinden & Cambon-Bonavita 2003). Interestingly, these chemolithoautotrophic bacteria cited above are able to reduce nitrate. Although nitrate is depleted in hydrothermal fluids (but available in seawater), its role as a terminal electron acceptor in the metabolism of thermophilic organisms has been only recently established (Alain *et al.* 2003, Vetriani *et al.* 2004), on contrast to elemental sulfur usually used to cultivate thermophilic microorganisms originating from deep-sea hydrothermal vents.

In this respect, our results expand the range of known microbiological settings existing in the deep-sea hydrothermal fields of the Mid-Atlantic Ridge.

New methods to access the uncultured

Many attempts to isolate novel microorganisms involve innovative strategies. Micromanipulator techniques (Frohlich & Konig 2000) and optical tweezers (Ashkin *et al.* 1987) were used to attempt the isolation of single prokaryotic cells. Zengler *et al.* (Zengler *et al.* 2002) described a method involving encapsulation of cells in gel microdroplets. This latter technique presents analogies with the continuous enrichment culture in gas-lift bioreactor (this study). Both involve continuous culture, low dilution rate, and long-time running culture, probably representing conditions close to the natural environment, and may constitute a good way to enrich and isolate new microorganisms.

Conclusion

Continuous enrichment culture performed in gas-lift bioreactor was shown to be an improved method to expand our view of the cultivable microbial community inhabiting deep-sea hydrothermal black smokers. The microbial diversity detected in traditional batch enrichment cultures in vials was lower than that obtained from the bioreactor. All the sequences retrieved in this study, archaeal or bacterial, obtained from cultures in vials or in the bioreactor, were related to cultured microorganisms originating from deep-sea hydrothermal environments. Molecular methods to assess the microbial diversity gave important data to guide the isolation of new prokaryotic strains as shown in this study. Without change in the experimental conditions, whole-cell hybridization analysis and data from the clone libraries revealed a clear evolution of the community structure, indicating a dynamics among the cultivated microbial community. Thanks to the continuous culture in bioreactor, it was possible to maintain in culture heterotrophic strains and autotrophic strains for several weeks. This was an unexpected result considering the organic rich medium supplied and indicated that metabolic products of the heterotrophs helped to support the growth of the autotrophic populations. The extended duration of culture in the bioreactor allowed cells to interact primarily by means of end products of primary metabolism (fermentative pathway) that are released and taken up. These interactions could be important factors permitting the growth of as-yet uncultivated microorganisms.

The impact of the environment on a microbial community might be very intense in deep-sea hydrothermal systems, since steep physico-chemical gradients are expected to exist, in the range approximately of 350°C at pH3 to 4°C at pH7 in the case of a black smoker investigated (Charlou, *et al.* 2002). The gas-lift bioreactor combined with the use of molecular tools to monitor the microbial population structure could be used to investigate the effect of environmental perturbations on the microbial community composition.

Acknowledgements

The authors want to thank P.M. Sarradin, chief scientist of the ATOS cruise, as well as the captain and crew of the Atalante and the Victor team. This work was supported by Ifremer, European VENTOX Program and Région Bretagne. We also wish to thank Dr C. L. Van Dover for her helpful reading of the manuscript.

Table 1. Distribution and phylogenetic affiliations of archaeal and bacterial 16S rDNA sequences ($\geq 97\%$ similarity in each phylotype) retrieved from enrichment cultures in the bioreactor at 60°C. Representative clones were completely sequenced, and the sequence types deposited in GenBank appear in bold.

Sample	Phylogenetic affiliation	Representative clones	Number of clones	Closest match organism ^a	identity ^a
T7	<i>Thermococcales</i>	A704 - A710- A712- A715- A730-A732- A737-A739	76	<i>Thermococcus siculi</i> (AY099185)	98%
T28	<i>Thermococcales</i>	A800 -A811- A816-A817	71	<i>Thermococcus siculi</i> (AY099185)	98%
T7	<i>Clostridiales</i>	775 -700-725- 728-750-770-	38	<i>Caminicella sporogenes</i> (AJ320233)	97%
	<i>Thermotogales</i>	716-705-706- 709-724-768	29	<i>Marinitoga camini</i> (AJ250439)	94%
	<i>Deferribacterales</i>	737-711-740- 754-769	9	<i>Deferribacter abyssi</i> (AJ515882)	98%
T28	<i>Clostridiales</i>	813 -874	5	<i>Caminicella sporogenes</i> (AJ320233)	97%
	<i>Thermotogales</i>	805 -802-822- 823-832	35	<i>Marinitoga camini</i> (AJ250439)	95%
		840 -812-821- 825-868-884-893	12	<i>Thermosipho</i> MV1063 (AJ419874)	99%
	<i>Deferribacterales</i>	820 -829-856	17	<i>Deferribacter abyssi</i> (AJ515882)	98%
	<i>Thermodesulfobacteriales</i>	850 -816-858	3	<i>Thermodesulfatator indicus</i> (AF393376)	96%

^a Based on BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). GenBank accession numbers are in brackets.

Table 2. Identification of the representative DGGE bands and their distribution among DGGE patterns corresponding to different culture samples from the continuous culture in bioreactor (noted from T1 to T36).

Representative band	Occurrence	Closest match organism^a	identity^a
T2a-T9c	T1 to T36	<i>Thermosipho</i> MV1063 (AJ419874)	99%
T31	T31	<i>Marinitoga camini</i> (AJ250439)	96%
T4-T9b	T4 to T31	<i>Caminicella sporogenes</i> (AJ320233)	99%-98%
T28	T1 to T31	<i>Deferribacter abyssi</i> (AJ515881)	87%

^a Based on BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). GenBank accession numbers are in brackets.

Table 3. Distribution and phylogenetic affiliations of archaeal and bacterial 16S rDNA sequences ($\geq 97\%$ similarity in each phylotype) retrieved from enrichment cultures in flask at 60°C. Representative clones were completely sequenced (unless indicated) and the sequence types deposited in GenBank appear in bold.

Sample	Phylogenetic affiliation	Representative clones	Number of clones	Closest match organism ^a	identity ^a
A1	<i>Thermococcales</i>	A254	55	<i>Thermococcus barophilus</i> (AY099172)	97%
A1	<i>Clostridiales</i>	238	1	<i>Caminicella sporogenes</i> (AJ320233)	97%
	<i>Thermotogales</i>	207-245-219-240-255	58	<i>Marinitoga camini</i> (AJ250439)	94%
A2	<i>Clostridiales</i>	413 -404-462	47	<i>Caminicella sporogenes</i> (AJ320233)	97%
	<i>Thermotogales</i>	436	8	<i>Marinitoga camini</i> (AJ250439)	95%
		440 ^b	1	<i>Thermosipho</i> MV1063 (AJ419874)	98%
B	<i>Clostridiales</i>	608 -626-669-635	68	<i>Caminicella sporogenes</i> (AJ320233)	97%
	<i>Thermotogales</i>	660 ^b	1	<i>Marinitoga camini</i> (AJ250439)	93%
		609	1	<i>Thermosipho</i> MV1063 (AJ419874)	97%

^a Based on BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). GenBank accession numbers are indicated in brackets.

^b Partial sequence (600pb)

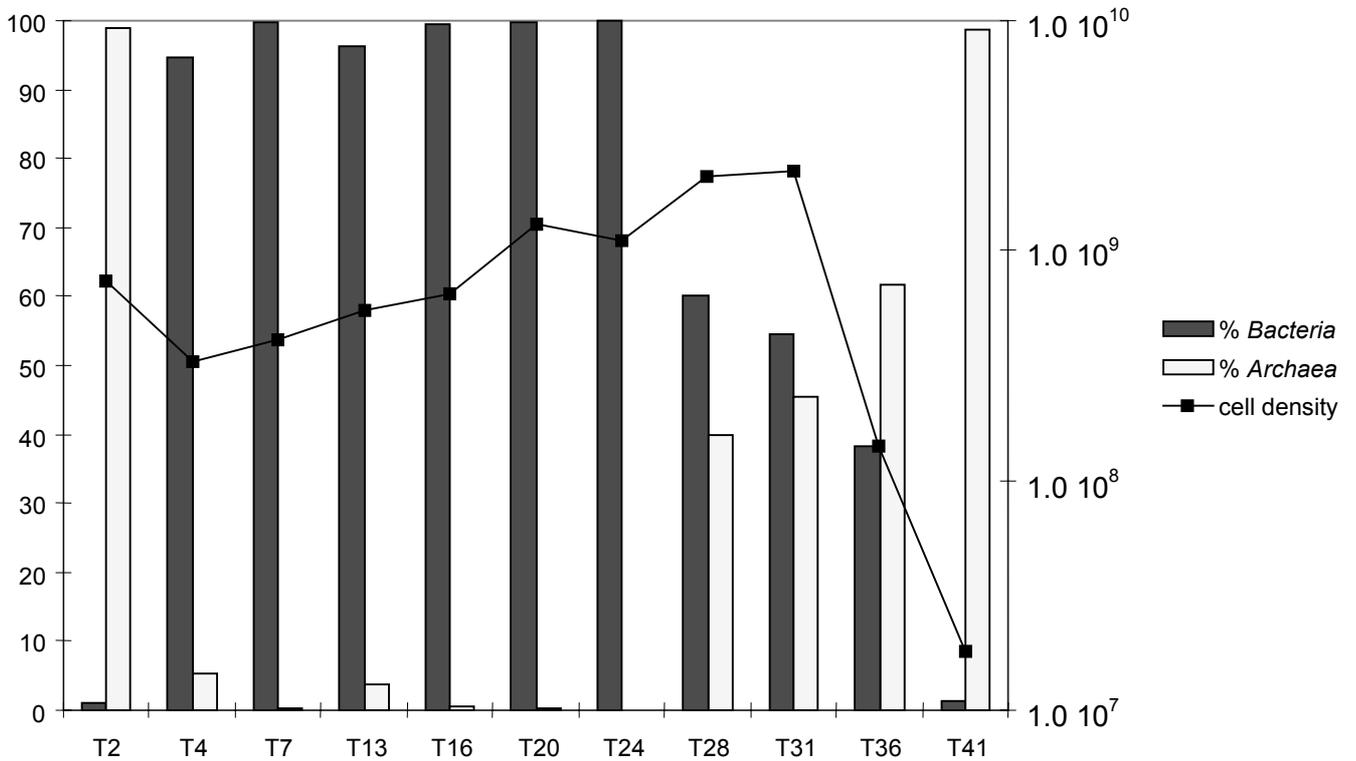


Figure 1. FISH analysis results and cell densities of culture samples collected from T2 to T41 from the bioreactor. *Archaea* and *Bacteria* cells were hybridized with the universal probes ARC915 and EUB338; results are expressed in percentages. Cell densities are expressed in cell ml⁻¹. The temperature was increased from 60°C to 70°C at T31 and to 80°C at T36.

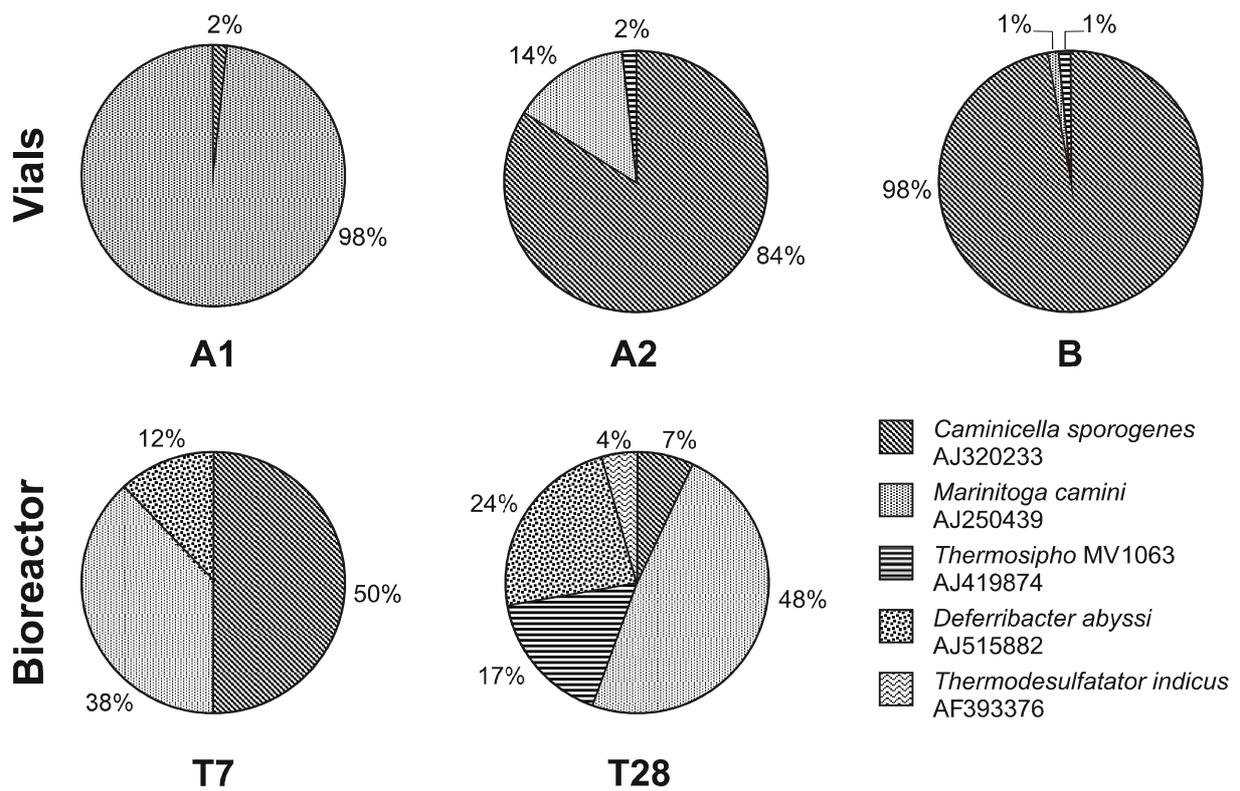


Figure 2. Composition of the bacterial clone libraries from enrichment cultures in vials (A1: 24 hours culture, A2: 41 hours culture and B: 17 hours subculture from A1) and from the enrichment culture in bioreactor (T7: 7 days culture, T28: 28 days culture). The percentages of clones retrieved for each phylogenetic group are indicated on the pie-charts.

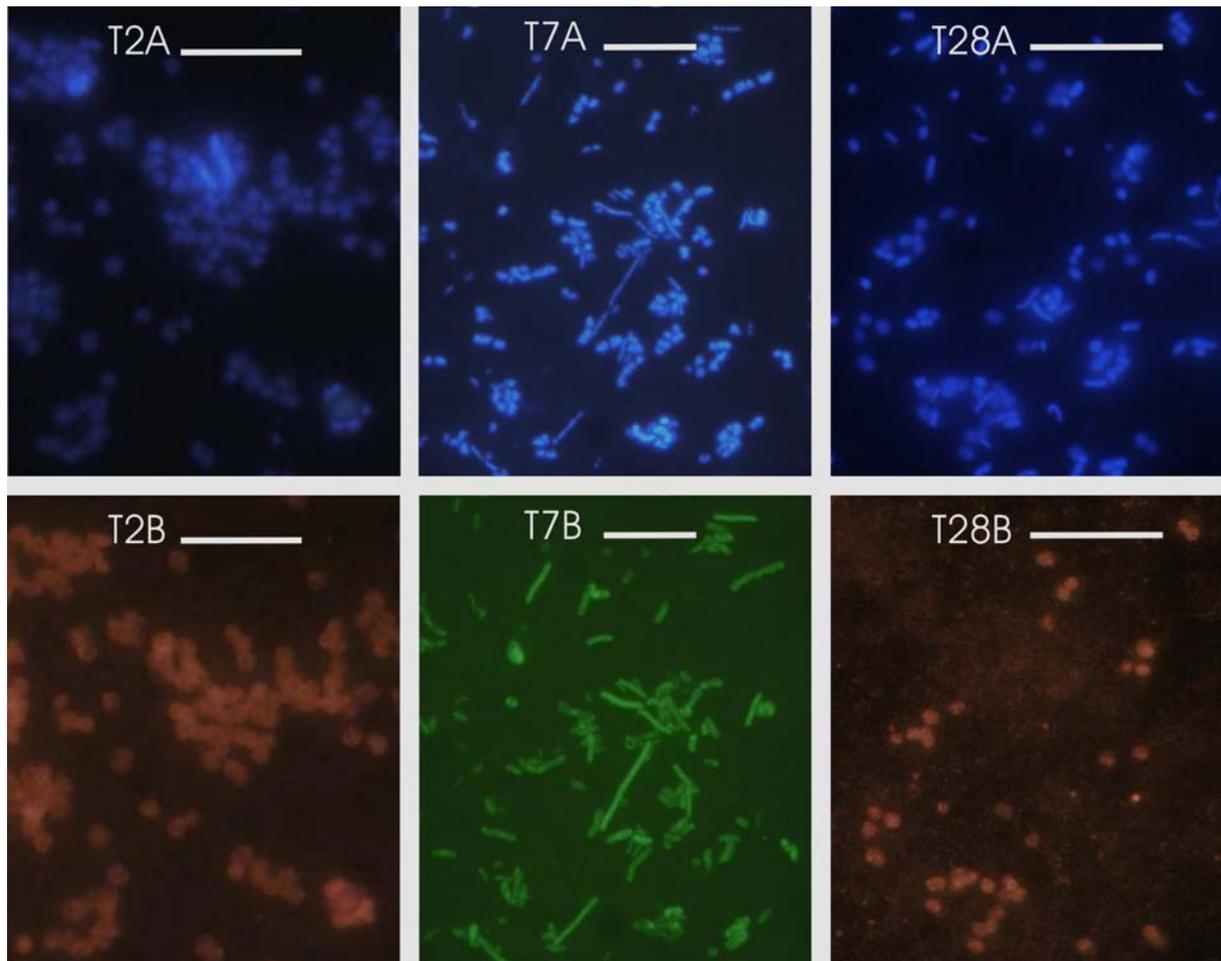


Figure 3. Whole-cell hybridization of fixed cells from 3 samples (T2, T7 and T28) collected from the enrichment culture in bioreactor. Cells were stained with DAPI (T2A, T7A and T28 A), and hybridized with the FITC-labeled Eub338 probe (T7B), or the Cy-3-labeled Arch 915 (T2B and T28B). Cells were viewed by epifluorescence microscopy in which DAPI-, FITC- and Cy-3-specific filters were used. The relative proportions of archaeal and bacterial cells were determined by counting approximately 2000 cells on filter and resulted in: 99.0% of the cells detected at T2 belonged to the *Archaea* (see T2B), 99.0% of the cells detected at T7 belonged to the *Bacteria* (see T7B), 40% of the cells detected at T28 belonged to the *Archaea* (see T28B). Scale bars = 10 μm .

References

- Alain, K., Ollagnon, M., Desbruyeres, D., Page, A., Barbier, G., Juniper, S. K., Querellou, J. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2002a). Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**, 463-476.
- Alain, K., Pignet, P., Zbinden, M., Quillevere, M., Duchiron, F., Donval, J. P., Lesongeur, F., Raguènes, G., Crassous, P., Querellou, J. & Cambon-Bonavita, M. A. (2002b). *Caminiella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1621-1628.
- Alain, K., Rolland, S., Crassous, P., Lesongeur, F., Zbinden, M., LeGall, C., Godfroy, A., Page, A., Juniper, S. K., Cambon-Bonavita, M.-A., Duchiron, F. & Querellou, J. (2003). *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles* **7**, 361-370.
- Alain, K., Zbinden, M., Le Bris, N., Lesongeur, F., Quérellou, J., Gaill, F. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2004). Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology* **6**, 227-241.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M. & Yamane, T. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* **330**, 769 - 771.
- Barns, S., Fundyga, R., Jeffries, M. & Pace, N. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring Environment. *PNAS* **91**, 1609-1613.
- Canganella, F., Jones, W. J., Gambacorta, A. & Antranikian, G. (1998). *Thermococcus guaymasensis* sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic archaea isolated from the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *Int. J. System. Bacteriol.* **48**, 1181-1185.
- Charlou, J. L., Donval, J. P., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P. & Holm, N. (2002). Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14'N, MAR). *Chemical Geology* **191**, 345-359.
- Corre, E. 2000. Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes: les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. Thèse, Université de Bretagne Occidentale, France.
- DeLong, E. (1992). Archaea in Coastal Marine Environments. *PNAS* **89**, 5685-5689.
- Frohlich, J. & König, H. (2000). New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 567-572.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* **12**, 543-548.
- Godfroy, A., Lesongeur, F., Raguènes, G., Quérellou, J., Antoine, E., Meunier, J.-R., Guezennec, J. & Barbier, G. (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 622-626.
- Godfroy, A., Meunier, J.-R., Guezennec, J., Lesongeur, F., Raguènes, G., Rimbault, A. & Barbier, G. (1996). *Thermococcus fumicolans* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeum isolated from deep-sea hydrothermal vent in North Fiji basin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1113-1119.
- Godfroy, A., Raven, N. D. H. & Sharp, R. J. (2000). Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 127-132.

- Grote, R., Li, L. N., Tamaoka, J., Kato, C., Horikoshi, K. & Antranikian, G. (1999).** *Thermococcus siculi* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Mid-Okinawa Trough. *Extremophiles* **3**, 55-62.
- Harmsen, H. J. M., Prieur, D. & Jeanthon, C. (1997).** Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2876-2883.
- Head, I. M., Saunders, J. R. & Pickup, R. W. (1998).** Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* **35**, 1 - 21.
- Huber, J. A., Butterfield, D. A. & Baross, J. A. (2002).** Temporal Changes in Archaeal Diversity and Chemistry in a Mid-Ocean Ridge Subseafloor Habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1585-1594.
- Huber, J. A., Butterfield, D. A. & Baross, J. A. (2003).** Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 393-409.
- López-García, P., Duperron, S., Philippot, P., Foriel, J., Susini, S. and Moreira, D. (2003).** Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilon-proteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* **5**, 961-976.
- Marteinsson, V., Birrien, J., Reysenbach, A., Vernet, M., Marie, D., Gambacorta, A., Messner, P., Sleytr, U. & Prieur, D. (1999).** *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 351-359.
- Miroshnichenko, M. L., L'Haridon, S., Nercessian, O., Antipov, A. N., Kostrikina, N. A., Tindall, B. J., Schumann, P., Spring, S., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E. A. & Jeanthon, C. (2003a).** *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Thermaceae from a deep-sea hot vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1143-1148.
- Miroshnichenko, M. L., L'Haridon, S., Schumann, P., Spring, S., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Jeanthon, C. & Stackebrandt, E. (2004).** *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of *Nautiliales* ord. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 41-45.
- Miroshnichenko, M. L., Slobodkin, A. I., Kostrikina, N. A., L'Haridon, S., Nercessian, O., Spring, S., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E. A. & Jeanthon, C. (2003b).** *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1637-1641.
- Moussard, H., L'Haridon, S., Tindall, B. J., Banta, A., Schumann, P., Stackebrandt, E., Reysenbach, A.-L. & Jeanthon, C. (2004).** *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 227-233.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- Nercessian, O., Reysenbach, A.-L., Prieur, D. & Jeanthon, C. (2003).** Archaeal diversity associated with *in situ* samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). *Environ. Microbiol.* **5**, 492-502.
- O'Brien, D., Carton, M., Eardly, D. & Patching, J. W. (1998).** In situ filtration and preliminary molecular analysis of microbial biomass from the Rainbow hydrothermal plume at 36[deg]15'N on the Mid-Atlantic Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* **157**, 223-231.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J. & Olsen, G. J. (1986).** The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology* **9**, 1-55.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., Marsic, D., Beg, A. K. & Garriott, O. K. (non publié, 2004).** *Thermococcus thioreducers* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent.

- Pledger, R. J. & Baross, J. A. (1991).** Preliminary description and nutritional characterization of a chemoorganotrophic archaeobacterium growing at temperature up to 110°C isolated from a submarine hydrothermal vent environment. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 203-211.
- Postec, A., Le Breton, C., Fardeau, M.-L., Lesongeur, F., Pignet, P., Querellou, J., Ollivier, B. & Godfroy, A. (2005).** *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov., a novel member of the order *Thermotogales* isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1217-1221.
- Postec, A., Pignet, P., Cueff-Gauchard, V., Schmitt, A., Querellou, J. & Godfroy, A. (2005a).** Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media. *Research in Microbiology* **156**, 82-87.
- Postec, A., Urios, L., Lesongeur, L., Ollivier, B., Querellou, J. & Godfroy, A. (2005b).** Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems. *Current microbiology* **50**, 1-7.
- Raven, N., Ladwa, N. & Sharp, R. (1992).** Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 263-267.
- Raven, N. D. H. & Sharp, R. J. (1997).** Development of defined and minimal media for the growth of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* Vc1. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**, 135-141.
- Reysenbach, A.-L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000).** Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3798-3806.
- Schrenk, M. O., Kelley, D. S., Delaney, J. R. & 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.
- Sharp, R. J. & Raven, N. D. H. (1997).** Isolation and growth of hyperthermophiles, p. 23-51. In P. M. Rhodes and P. F. Stanbury (ed.), *Applied Microbial Physiology : A practical approach*. IRL Press, Oxford University press.
- Suzuki, M. & Giovannoni, S. (1996).** Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 625-630.
- Takai, K. & Horikoshi, K. (1999).** Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments. *Genetics* **152**, 1285-1297.
- Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F. & Horikoshi, K. (2001).** Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3618-3629.
- Theron, J. & Cloete, T. E. (2000).** Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments. *Critical Reviews in Microbiology* **26**, 37-57.
- Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Urios, L., Cueff-Gauchard, V., Pignet, P., Postec, A., Fardeau, M.-L., Ollivier, B. & Barbier, G. (2004).** *Thermosipho atlanticus* sp. nov., a novel member of the *Thermotogales* isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1953-1957.
- Vetriani, C., Speck, M. D., Ellor, S. V., Lutz, R. A. & Starovoytov, V. (2004).** *Thermovibrio ammonificans* sp. nov., a thermophilic, chemolithotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 175-181.
- Voordeckers, J. W., Starovoytov, V. & Vetriani, C. (sous presse, 2005).** *Caminibacter mediatlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

- Wery, N., Cambon-Bonavita, M.-A., Lesongeur, F. & Barbier, G. (2002).** Diversity of anaerobic heterotrophic thermophiles isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**, 105-114.
- Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M., Godfroy, A. & Barbier, G. (2001).** *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 495-504.
- Zbinden, M. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2003).** Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**, 23-30.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. & Keller, M. (2002).** Cultivating the uncultured. *PNAS* **99**, 15681-15686.

Chapitre 4

Caractérisation d'une nouvelle espèce bactérienne du genre *Marinitoga*

Article sous presse :

Postec, A., Le Breton, C., Fardeau, M.-L., Lesongeur, F., Pignet, P., Querellou, J., Ollivier, B. & Godfroy, A. (2005). *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov., a novel member of the order *Thermotogales* isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1217-1221.

Une nouvelle espèce du genre *Marinitoga*, isolée à partir de la culture d'enrichissement en bioréacteur à 60°C, a fait l'objet d'une description présentée dans ce chapitre. Cette souche appartient à l'ordre des *Thermotogales*, et deux espèces du genre *Marinitoga* ont précédemment été décrites, toutes deux d'origine hydrothermale océanique profonde. La nouvelle espèce de cette étude a pour représentant le plus proche *M. camini*. Elle a été nommée *M. hydrogenitolerans* du fait de sa tolérance à la présence d'hydrogène dans la phase gazeuse qui constitue son principal caractère discriminant.

Marinitoga hydrogenitolerans sp. nov., a novel member of the order *Thermotogales* isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge

Anne Postec,¹ Claire Le Breton,¹ Marie-Laure Fardeau,²
Françoise Lesongeur,¹ Patricia Pignet,¹ Joël Querellou,¹
Bernard Ollivier² and Anne Godfroy¹

Correspondence

Anne Postec

Anne.Postec@ifremer.fr

¹Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

²Laboratoire IRD de Microbiologie des Anaérobies, UR 101, Universités de Provence et de la Méditerranée, CESB-ESIL, case 925, 163 avenue de Luminy, 13288 Marseille, France

A novel, thermophilic, anaerobic bacterium that is able to tolerate hydrogen was isolated from a deep-sea hydrothermal chimney collected at the Rainbow field on the Mid-Atlantic Ridge. Cells were rod-shaped and surrounded by a sheath-like outer structure (toga); they were weakly motile by means of a polar flagellum. They appeared singly, in pairs or in short chains. They grew at 35–65 °C (optimum 60 °C), pH 4.5–8.5 (optimum pH 6.0) and 10–65 g sea salts l⁻¹ (optimum 30–40 g l⁻¹). The isolate was organotrophic, and able to grow on various carbohydrates or complex proteinaceous substrates. Growth was not inhibited under 100 % hydrogen or in the presence of 2 % oxygen in the gas phase. The isolate reduces sulfur, although sulfur reduction is not required for growth. The fermentation products identified on glucose were acetate, ethanol, formate, hydrogen and CO₂. The G + C content of the genomic DNA was 28 ± 1 mol%. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene placed the strain within the genus *Marinitoga*, order *Thermotogales*, in the bacterial domain. On the basis of the 16S rRNA gene sequence comparisons and physiological characteristics, the isolate is considered to represent a novel species, for which the name *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov. is proposed. The type strain is AT1271^T (= DSM 16785^T = JCM 12826^T).

The order *Thermotogales* comprises rod-shaped, Gram-negative, non-sporulating bacteria that have a loose surrounding membrane or 'toga'. They are anaerobic, organotrophic and thermophilic. These organisms have been isolated from a variety of environments, such as oil reservoirs, hot springs and marine hydrothermal vents (Antoine *et al.*, 1997; Lien *et al.*, 1998; Windberger *et al.*, 1989). The order *Thermotogales* includes six genera: *Thermotoga*, *Thermosipho*, *Fervidobacterium*, *Petrotoga*, *Geotoga* and *Marinitoga* (Davey *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 1986, 1989; Patel *et al.*, 1985; Wery *et al.*, 2001a). To date, only two species belonging to the genus *Marinitoga* have been described, *Marinitoga camini* (Wery *et al.*, 2001a) and *Marinitoga piezophila* (Alain *et al.*, 2002), both originating from deep-sea hydrothermal vents. Members of the order *Thermotogales* are fermentative bacteria that produce hydrogen, the accumulation of which has been widely

reported to inhibit their growth (Van Ooteghem *et al.*, 2002). This inhibition could be overcome by addition of elemental sulfur or thiosulfate (Alain *et al.*, 2002; Antoine *et al.*, 1997; Jeanthon *et al.*, 1995; Lien *et al.*, 1998). Here we report the description of a novel thermophilic bacterium belonging to the genus *Marinitoga* that is able to tolerate 100 % hydrogen in the headspace when growing on organic substrates.

Samples were collected by the ROV *Victor* in 2001 during the ATOS cruise on the Mid-Atlantic Ridge. The deep-sea vent field Rainbow (36° 13' N 33° 54' W) at 2275 m depth was explored and part of an active black smoker chimney was brought to the surface in a decontaminated insulated box. On board, eight subsamples representative of the whole chimney were crushed in an anaerobic chamber and stored in sterile serum vials filled with sterile sea water containing 0.5 mg Na₂S l⁻¹. The subsamples were pooled and used as inoculum at 2 % (v/v). A continuous enrichment culture was performed on a modified SME medium (Postec *et al.*, 2005; Sharp & Raven, 1997) in a litre gas-lift bioreactor (Godfroy *et al.*, 2000; Raven *et al.*, 1992) at 60 °C at

Published online ahead of print on 7 January 2005 as DOI 10.1099/ij.s.0.63550-0.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of AT1271^T is AJ786363.

<<paper no. ije63550 charlesworth ref: ije58665>>

A. Postec and others

atmospheric pressure. A culture sample collected on day 7 permitted the isolation of several strains by three serial dilutions to extinction (Baross, 1995). Single colonies were obtained by streaking on the same medium solidified with 15 g Gelrite l⁻¹ (Scott Laboratories). Plates were incubated for 2 days at 60 °C in anaerobic jars (Godfroy *et al.*, 1997). Colonies were subsequently picked and streaked twice under the same conditions. One isolate was referenced as strain AT1271^T and was chosen for further characterization.

Microscopic observations indicated that cells of isolate AT1271^T were weakly motile rods surrounded by a 'toga', an outer sheath-like structure. Cells were approximately 0.6 µm wide and 1.5 µm long during the exponential phase and appeared single or in short chains within the envelope. Cells became elongated, forming long chains, during stationary phase (Fig. 1). Cells were negatively stained for examination under a transmission electron microscope (Raguénès *et al.*, 1997): a polar flagellum and the presence of a toga were observed (Fig. 1). The Ryu KOH reaction (Powers, 1995) leading to immediate cell lysis, as confirmed by phase-contrast microscopy, was positive, indicating that cells of strain AT1271^T were Gram-negative.

The new isolate was routinely grown on GYPS medium containing (per litre): 5 g (+)-D-glucose (Sigma), 0.5 g yeast extract (Difco), 1 g bacto-peptone (Difco), 30 g sea salts (Sigma), 3.9 g MES buffer (Sigma) and 0.1% (v/v) resazurin solution. The pH was adjusted to 6.0 before autoclaving for 20 min at 121 °C. The medium was reduced

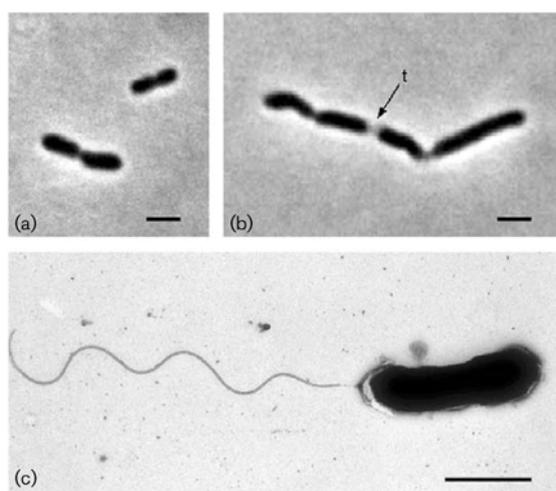


Fig. 1. (a, b) Phase-contrast micrographs of strain AT1271^T. (a) Rod-shaped cells in the mid-exponential phase of growth, dividing by constriction; bar, 1 µm. (b) Cells in a chain surrounded by a sheath-like structure or 'toga' (t); bar, 1 µm. (c) Electron micrograph of a negatively stained cell showing the polar flagellum; bar, 1 µm.

by addition of 0.5 g H₂S before inoculation. Cultures were incubated under anaerobic conditions, N₂/H₂/CO₂ (90:5:5), at atmospheric pressure. All experiments were performed in triplicate. Methods for the determination of growth parameters was as described by Wery *et al.* (2001b). Bacterial growth was directly monitored in culture tubes by spectrometry at 600 nm (a Spectronic 401 instrument; Milton Roy). Previous correlation between the optical density at 600 nm and cell numeration was simultaneously established by direct counting of the cells using a Thoma chamber viewed with an Olympus model BH-2 microscope. Isolate AT1271^T grew at 35–65 °C; the optimum temperature was 60 °C. Growth occurred at pH 4.5–8.5, the optimum being around pH 6. No growth was observed at pH 4 or pH 9. The strain grew at sea salt concentrations ranging from 10 to 65 g l⁻¹ (corresponding to 8–50 g NaCl l⁻¹). The optimum sea salt concentration for growth was approximately 35 g l⁻¹ (corresponding to 27 g NaCl l⁻¹). Under optimal conditions, the maximal cell density obtained was 6.0 × 10⁸ cells ml⁻¹ and the maximal observed growth rate was 0.37 h⁻¹ (equivalent to a doubling time of 1.9 h).

Strain AT1271^T is an obligate chemo-organotroph. No growth was detected on mineral media complemented with a H₂/CO₂ (80:20) headspace. The ability of the isolate to use various carbon sources was tested in medium containing (per litre): 30 g sea salts, 3.9 g MES buffer, 10 ml vitamin solution (Balch *et al.*, 1979), 10 ml mineral solution (Balch *et al.*, 1979), 0.1 g yeast extract as the nitrogen source and complex carbon sources. The following carbohydrates were tested at 0.5% (w/v): cellobiose, glucose, maltose, fructose, galactose, ribose, starch, cellulose, glycogen, chitin, pectin and carboxymethylcellulose. Ethanol was tested at 0.5% (v/v). The following organic acids and proteinaceous substrates were tested at 0.2% (w/v): acetate, pyruvate, yeast extract, brain heart infusion, peptone, tryptone, casein, Casamino acids and keratin. A solution of 20 amino acids, each at 0.1 g l⁻¹, was also tested. Positive cultures were confirmed by subcultures on the same medium. Compared with growth on the medium without added carbon source, growth was enhanced by addition of glucose, starch, glycogen, chitin, yeast extract, brain heart infusion, peptone and casein. To extend the investigation of carbohydrate consumption, cellobiose, glucose, maltose, fructose, galactose, ribose, acetate, pyruvate and rhamnose were tested at 1 g l⁻¹ in the presence 1 g yeast extract l⁻¹. A negative control was performed without added sugar. Growth was monitored by spectrometry and carbohydrate concentrations were estimated by HPLC after 6 and 13 h of culture. At these conditions, growth of strain AT1271^T was enhanced when pyruvate or maltose were added. Nitrogen sources were tested in medium containing (per litre): 30 g sea salts, 3.9 g MES buffer, 10 ml Balch vitamins, 10 ml mineral solution and glucose (5 g l⁻¹). Growth occurred in the presence of yeast extract (0.2 g l⁻¹), whereas urea (0.2 g l⁻¹) and NH₄Cl (1 g l⁻¹) alone did not support growth.

The end-products of glucose metabolism were acetate, ethanol, formate, hydrogen and CO₂. In the presence of elemental sulfur, no hydrogen was detected. Growth in the presence of different electron acceptors was tested on GYPS medium. A small increase in the final cell concentration was obtained when thiosulfate (20 mM), cystine (50 mM) or sulfur (10 g l⁻¹) were added. Addition of sulfate (20 mM), sulfite (1 mM), nitrate (20 mM) or nitrite (1 mM) did not enhance growth. Strong production of H₂S was revealed by using lead acetate strips (Whatman) on the culture with cystine and sulfur, indicating the use of these electron acceptors.

Various gas phases were tested in the presence and absence of sulfur (10 g l⁻¹) on GYPS medium: N₂/H₂/CO₂ (90:5:5), H₂/CO₂ (80:20), N₂/CO₂ (80:20) and N₂ (100%). Cell density was above 1 × 10⁸ ml⁻¹ in the absence of sulfur, and above 4 × 10⁸ ml⁻¹ in the presence of sulfur, regardless of the gas phase.

The effect of H₂ in the gas phase was tested using the following N₂/H₂ ratios: 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 and 0:100. *M. camini*, *M. piezophila* and strain AT1271^T were grown for comparison in triplicate on GYPS at their optimal growth temperatures, respectively 50, 65 and 60 °C. The initial gas phase of the culture medium (N₂/H₂/CO₂ 90:5:5) was replaced and 10 cycles of vacuum extraction/addition of the different calibrated mixtures of N₂/H₂ were performed. Cell densities were estimated after 4, 8, 12 and 24 h of incubation by counting. No significant difference appeared between controls made with N₂/H₂/CO₂ (90:5:5). Maximal cell concentrations for *M. camini* and *M. piezophila* were obtained with 0% H₂. By contrast, no growth was observed for either species with 80% H₂ (Alain *et al.*, 2002; Wery *et al.*, 2001a). *M. camini* and *M. piezophila* displayed a linear decrease in maximal cell concentration with H₂ increase, and total inhibition of growth at 40 and 60% H₂, respectively. In contrast, strain AT1271^T grew at up to 2–4 × 10⁸ cells ml⁻¹ regardless of H₂ concentration. Strain AT1271^T tolerates up to 2% oxygen in the gas phase. Growth was inhibited in the presence of 4% oxygen.

Genomic DNA was extracted as described by Wery *et al.* (2001a). The G+C content was determined by thermal denaturation (Marmur & Doty, 1962) with the modifications described by Raguénès *et al.* (1997). The G+C content of the genomic DNA of strain AT1271^T was 28 ± 1 mol%. The 16S rRNA gene was selectively amplified as described by Wery *et al.* (2001b), and the PCR product was sequenced with the primers described by Raguénès *et al.* (1996). The sequence was then compared with available sequences in the GenBank database using a BLAST search (Altschul *et al.*, 1990). A multiple sequence file was obtained by using the Wisconsin Package version 10.3 (Accelrys Inc.). Alignments and similarity levels were obtained by the CLUSTAL W method with weighted residues (Thompson *et al.*, 1994). Alignments were manually refined using the multiple sequence alignment editor SEAVIEW and the phylogenetic reconstruction was produced using PHYLO_WIN (Galtier

et al., 1996) with the following algorithms: Jukes–Cantor distance matrix and successively the neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987), maximum-parsimony and maximum-likelihood methods (Felsenstein, 1981). Bootstraps values (Felsenstein, 1985) were determined. Strain AT1271^T was phylogenetically affiliated to the genus *Marinitoga* (Fig. 2), the nearest recognized relatives being *M. camini* and *M. piezophila* with respective 16S rRNA gene sequence similarities of 96 and 94%. The positioning of strain AT1271^T was supported by the results of the three algorithms used.

The characteristics of strain AT1271^T are consistent with its assignment to the order *Thermotogales*. On the basis of the results of 16S rRNA gene sequence analysis, the new isolate is most closely related to *M. camini*, the first species described among the genus *Marinitoga*. *M. camini* and strain AT1271^T both originated from the Mid-Atlantic Ridge. However, strain AT1271^T can be distinguished from *M. camini* based on phylogenetic and phenotypic criteria: the two share 96% 16S rRNA gene sequence similarity. Also, in comparison with *M. camini*, the pH range and pH optimum for the new isolate were lower and optimum NaCl concentration for growth was higher (30–40 versus 20 g l⁻¹) (Table 1). Moreover, unlike *M. camini*, strain AT1271^T does not use sucrose, fructose, cellobiose, cellulose, carboxymethylcellulose or pectin, and it does ferment casein. It is noteworthy that strain AT1271^T tolerates 100% hydrogen in the gas phase whereas the growth of other *Marinitoga* species is inhibited at lower hydrogen concentrations. This tolerance to hydrogen has never been reported to date among the order *Thermotogales*, and could be related to the high hydrogen concentrations measured (16 mmol kg⁻¹) in all vent fluids at the Rainbow field,

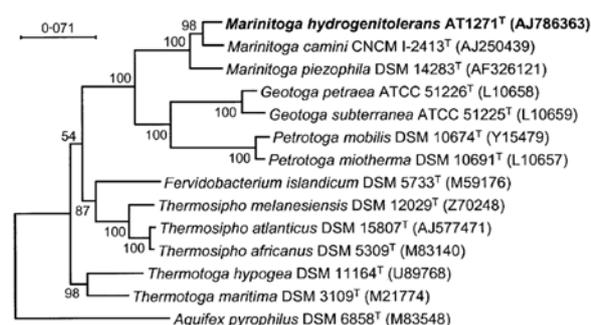


Fig. 2. Phylogenetic position of strain AT1271^T within the order *Thermotogales* based on 16S rRNA gene sequences. A total of 1351 sites were used for the phylogenetic analysis. Accession numbers and type strains are indicated. The topology shown corresponds to an unrooted tree obtained by a neighbour-joining algorithm (Jukes–Cantor corrections) established using PHYLO_WIN and manually refined using SEAVIEW. Bootstrap values are displayed on their relatives branches. Bar, 7.1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

<<paper no. ije63550 charlesworth ref: ije58665>>

A. Postec and others

Table 1. Characteristics used to differentiate members of the genus *Marinitoga*

+, Positive, -, negative; (+), weakly positive; ND, not determined. Substrates were tested in the presence of 0.1 g yeast extract l⁻¹, except *M. piezophila* (0.2 g l⁻¹). All three type strains were isolated from hydrothermal vents: EPR, East-Pacific Ridge; MAR, Mid-Atlantic Ridge.

Characteristic	<i>M. camini</i> MV1075 ^T	<i>M. piezophila</i> KA3 ^T	AT1271 ^T
Reference	Wery <i>et al.</i> (2001a)	Alain <i>et al.</i> (2002)	This study
Origin	MAR, Menez-Gwen site (31° 31' W 37° 51' N)	EPR, Grandbonum site (12° 48' N 103° 56' W)	MAR, Rainbow site (36° 13' N 33° 54' W)
Motility	+	+	(+)
pH for growth			
Range	5–9	5–8	4.5–8.5
Optimum	7	6	6
Temperature for growth (°C)			
Range	25–65	45–70	35–65
Optimum	55	65	60
NaCl concentration for growth (g l ⁻¹)			
Range	10–45	10–50	10–65
Optimum	20	30	30–40
Optimal doubling time (min)	102	21 (at 40 MPa)	112
Utilization of:			
Casein	–	+	+
Tryptone	+	+	–
Casamino acid	–	+	–
Fructose	(+)	+	–
Cellobiose	(+)	+	–
Galactose	–	+	–
Ribose	–	(+)	–
Carboxymethylcellulose	+	ND	–
Pectin	+	ND	–
Cellulose	+	ND	–
Glycogen	ND	–	+
Pyruvate	+	–	+
H ₂ inhibition	From 40% H ₂	From 60% H ₂	No inhibition
Products of glucose fermentation	Acetate, H ₂ , CO ₂	ND	Acetate, ethanol, formate, H ₂ , CO ₂

the site from where strain AT1271^T was recovered (Charlou *et al.*, 2002).

On the basis of its genetic and phenotypic characteristics, we propose that strain AT1271^T should be assigned to a novel species of the genus *Marinitoga* belonging to the *Thermotogales*. On the basis of its high tolerance to hydrogen, the name *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov. is proposed.

Description of *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov.

Marinitoga hydrogenitolerans (hy.dro.ge.ni.to'le.rans. N.L. *hydrogenum* hydrogen; L. pres. part. *tolerans* tolerating; N.L. adj. *hydrogenitolerans* hydrogen-tolerating, referring to its ability to tolerate a high level of hydrogen in the headspace).

Rod-shaped, weakly motile, Gram-negative bacteria surrounded by a sheath-like structure. Growth occurs at 35–65 °C (optimum 60 °C), pH 4.5–8.5 (optimum pH 6.0)

and 10–65 g sea salts l⁻¹ (optimum 30–40 g l⁻¹). The doubling time under optimal conditions is 1.9 h and the maximum cell yield is 6.0 × 10⁸ cells ml⁻¹. Anaerobic; resistant to concentrations of oxygen up to 2% and hydrogen up to 100%. Chemo-organotrophic; able to ferment glucose, maltose, pyruvate, starch, glycogen, chitin, yeast extract, brain heart infusion, peptone and casein. Fermentation products identified on glucose are acetate, ethanol, formate, hydrogen and CO₂. Sulfur, cystine and thiosulfate stimulate slight growth and H₂S production is observed with sulfur and cystine. The G+C content of the genomic DNA of the type strain is 28 mol%. 16S rRNA gene sequence analysis indicates that the species is classified within the genus *Marinitoga*, order *Thermotogales* in the bacterial domain. 16S rRNA gene sequence similarity of the type strain to *M. camini* MV1075^T is 96%.

The type strain, AT1271^T (= DSM 16785^T = JCM 12826^T), was isolated from a sample collected on the Rainbow hydrothermal site on the Mid-Atlantic Ridge (36° 13' N 33° 54' W).

Acknowledgements

We wish to thank P. M. Sarrafin, chief scientist of the ATOS cruise, as well as the captain and crew of the *Atalante* and the *Victor* team. We thank Mélusine Gaillard and Gérard Sinquin for their technical support with transmission electron microscopy. We thank Laurent Urios for helpful discussions. This work was supported by Ifremer, European VENTOX Program (EVK3-CT1999-2003) and Région Bretagne.

References

- Alain, K., Marteinsson, V. T., Miroshnichenko, M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Prieur, D. & Birrien, J. L. (2002). *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1331–1339.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.
- Antoine, E., Cilia, V., Meunier, J., Guezennec, J., Lesongeur, F. & Barbier, G. (1997). *Thermosipho melanesiensis* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from deep-sea hydrothermal vents in the southwestern Pacific Ocean. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1118–1123.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* 43, 260–296.
- Baross, J. A. (1995). Isolation, growth and maintenance of hyperthermophiles. In *Archaea: a Laboratory Manual, Thermophiles*, pp. 15–23. Edited by F. T. Robb & A. R. Place. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Charlou, J. L., Donval, J. P., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P. & Holm, N. (2002). Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14'N, MAR). *Chem Geol* 191, 345–359.
- Davey, M. E., Wood, W. A., Key, R., Nakamura, K. & Stahl, D. (1993). Isolation of three species of *Geotoga* and *Petrotoga*: two new genera, representing a new lineage in the bacterial line of descent distantly related to the 'Thermotogales'. *Syst Appl Microbiol* 16, 191–200.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17, 368–376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12, 543–548.
- Godfroy, A., Lesongeur, F., Raguénès, G., Quéréllou, J., Antoine, E., Meunier, J.-R., Guezennec, J. & Barbier, G. (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* 47, 622–626.
- Godfroy, A., Raven, N. D. H. & Sharp, R. J. (2000). Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiol Lett* 186, 127–132.
- Huber, R., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B. & Stetter, K. O. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of uniquely extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch Microbiol* 144, 324–333.
- Huber, R., Woese, C. R., Langworthy, T. A., Fricke, H. & Stetter, K. O. (1989). *Thermosipho africanus* gen. nov., represents a new genus of thermophilic eubacteria within the "Thermotogales". *Syst Appl Microbiol* 12, 32–37.
- Jeanthon, C., Reysenbach, A.-L., L'Haridon, S., Gambacorta, A., Pace, N. R., Glenat, P. & Prieur, D. (1995). *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. *Arch Microbiol* 164, 91–97.
- Lien, T., Madsen, M., Rainey, F. A. & Birkeland, N. K. (1998). *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. *Int J Syst Bacteriol* 48, 1007–1013.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* 5, 109–118.
- Patel, B. K. C., Morgan, H. W. & Daniel, R. M. (1985). *Fervido-bacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* 141, 63–69.
- Postec, A., Urios, L., Lesongeur, L., Ollivier, B., Querellou, J. & Godfroy, A. (2005). Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting deep-sea hydrothermal ecosystems. *Curr Microbiol* 50 (in press). doi:10.1007/s00284-004-4443-z
- Powers, E. M. (1995). Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol* 61, 3756–3758.
- Raguénès, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G. & Guezennec, J. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl Environ Microbiol* 62, 67–73.
- Raguénès, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P. & Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol* 47, 989–995.
- Raven, N., Ladwa, N. & Sharp, R. (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 263–267.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406–425.
- Sharp, R. J. & Raven, N. D. H. (1997). Isolation and growth of hyperthermophiles. In *Applied Microbial Physiology: a Practical Approach*, pp. 23–51. Edited by P. M. Rhodes & P. F. Stanbury. Oxford: IRL Press.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673–4680.
- Van Ooteghem, S. A., Beer, S. K. & Yue, P. C. (2002). Hydrogen production by the thermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana*. *Appl Biochem Biotechnol* 98–100, 177–189.
- Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M. A., Godfroy, A. & Barbier, G. (2001a). *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 495–504.
- Wery, N., Moricet, J. M., Cueff, V., Jean, J., Pignet, P., Lesongeur, F., Cambon-Bonavita, M. A. & Barbier, G. (2001b). *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1789–1796.
- Windberger, E., Huber, R., Trincone, A., Fricke, H. & Stetter, K. O. (1989). *Thermotoga thermarum* sp. nov. and *Thermotoga neapolitana* occurring in African continental solfataric springs. *Arch Microbiol* 151, 506–512.

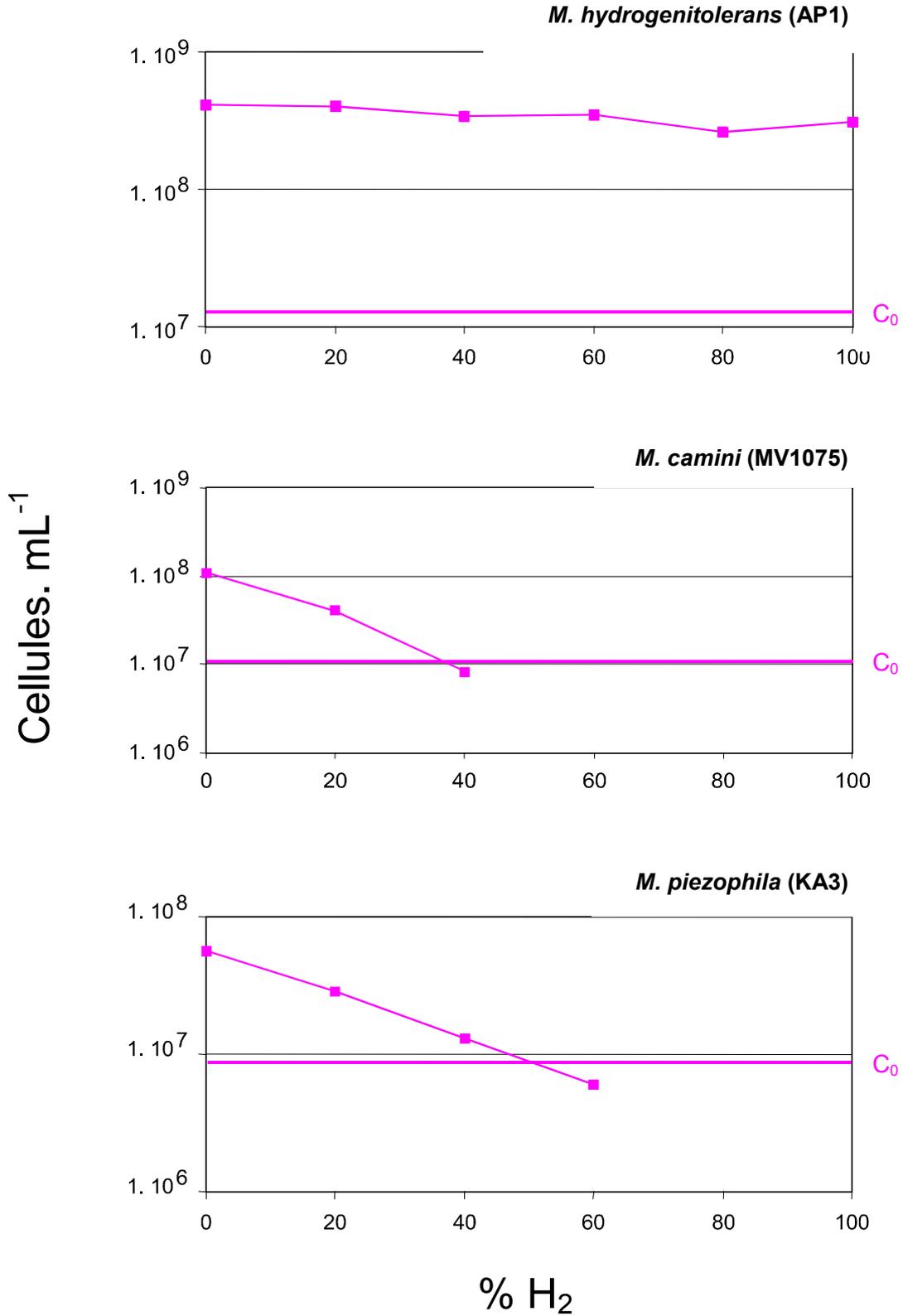
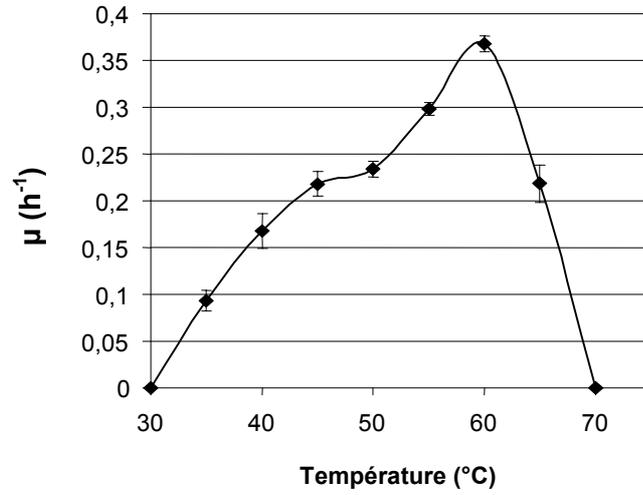
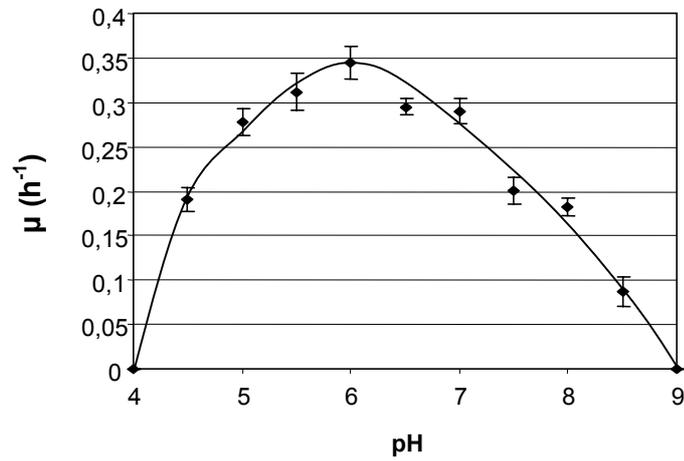


Figure 1 : Effet de la concentration de H₂ sur la densité cellulaire maximale (cellules. mL⁻¹) lors de la croissance de *M. hydrogenitolerans* (AP1), *M. camini* (MV1075) et *M. piezophila* (KA3). La concentration cellulaire initiale est représentée sur chaque graphique (C₀).

Optimum de température



Optimum de pH



Optimum de salinité

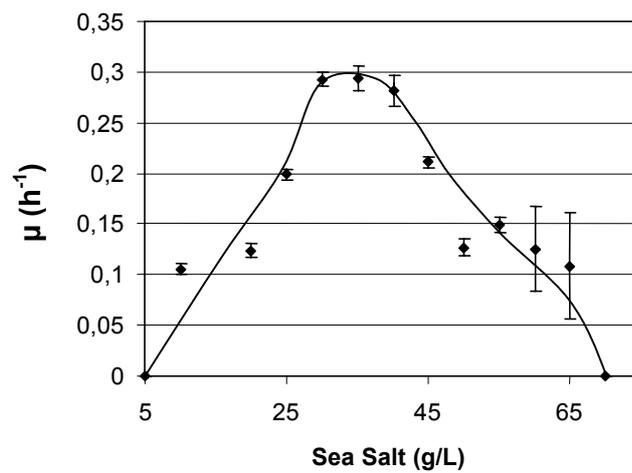


Figure 2 : Courbes représentant les optima de température, pH et salinité de *M. hydrogenitolerans* cultivée sur milieu GYPS.

Discussion générale

La diversité microbienne de la cheminée AT2E du site atlantique Rainbow est discutée ci-dessous, en s'appuyant sur les arbres phylogénétiques (Figures 2 à 5) qui présentent une vision synthétique de la diversité microbienne détectée par les différentes approches (culturelles et moléculaires) abordées durant cette étude.

Diversité des *Archaea* (Figure 2)

L'analyse de la diversité moléculaire directement associée à la cheminée a montré la présence d'un grand nombre de séquences, obtenues par clonage, affiliées aux genres *Methanothermococcus* et *Methanocaldococcus* qui appartiennent tous deux à l'ordre des *Methanococcales*. Toutefois, le pourcentage de clones dans une banque ne peut être considéré comme le reflet quantitatif de la représentation des microorganismes correspondant dans l'environnement. Etant donné que des séquences affiliées à ces deux genres ont également été obtenues par DGGE, nos résultats suggèrent donc une forte représentation des *Methanococcales* dans la cheminée. L'importance de ces *Archaea* méthanogènes résulterait de la présence concomitante de CO₂ et de H₂ en concentration élevée dans les fluides de Rainbow (Charlou *et al.* 2002). Ces microorganismes, de même que les *Archaeoglobales*, n'ont été détectés dans aucune des cultures d'enrichissement de notre étude, ce qui conforte l'idée que les microorganismes détectés par leur séquence dans les cultures, même les plus inattendus, ne sont pas des cellules en survie, mais correspondent à des microorganismes ayant réellement poussé.

Les *Thermococcales* ont été détectées dans toutes les cultures d'enrichissement, à 60°C et à 90°C, en flacon et en bioréacteur, et également dans l'échantillon de cheminée. Trois isolats ont été obtenus. Dans les cultures en flacon, toutes les séquences archéennes étaient affiliées au genre *Thermococcus*, et plus précisément au groupe de *T. barophilus*. Une séquence de l'échantillon de cheminée (EBA9) appartient également à ce groupe. Il est intéressant de noter que ce groupe n'a pas été détecté dans les cultures en bioréacteur, ce qui suggère un effet sélectif du système de culture mis en place. La séquence EBA63, issue de la cheminée, appartient au groupe *T. siculi*, de même qu'une séquence-type de la culture en bioréacteur à 60°C (A800), et une souche correspondant isolée de cette même culture (AT1273). Deux séquences étroitement apparentées à '*T. sulfurophilus*' ont été détectées dans chacune des cultures en bioréacteur, à 90°C et à 60°C (T28a-18 et A704 respectivement), et une souche correspondante a été isolée à partir de la culture à 90°C (AT1260). La description de cette espèce nouvelle est en cours à partir d'un autre isolat du site Rainbow (Pikuta *et al.*, com pers). La présence de séquences affiliées aux *Pyrococcus* n'a été montrée que dans la culture en bioréacteur à 90°C, et une souche correspondante a pu être isolée (AT1261). Les *Pyrococcus*, qui n'avaient pourtant pas été détectés dans l'échantillon de cheminée, ont pu être enrichis grâce à l'utilisation du bioréacteur.

Les *Thermococcales* ont d'ailleurs été retrouvés dans d'autres types d'environnement tels que les puits de pétrole ou des échantillons de subsurface. En raison de leur caractère ubiquiste, leur capacité de survie dans des conditions très éloignées de leurs conditions optimales de croissance, et leur potentialité de croissance rapide lorsque les conditions deviennent propices, les *Thermococcales* pourraient être les premiers colonisateurs hétérotrophes du pôle chaud de l'écosystème hydrothermal.

Diversité des ϵ -*Proteobacteria* (Figure 3)

La diversité des séquences d' ϵ -*Proteobacteria* obtenues dans notre étude est présentée dans l'arbre phylogénétique (Figure 3) qui inclut également des espèces d'origine hydrothermale océanique très récemment décrites telles que *Sulfurimonas autotrophica* (Inagaki *et al.* 2003), *Sulfurovum lithotrophicum* (Inagaki *et al.* 2004), *Caminibacter profundus* (Miroshnichenko *et al.* 2004), *Hydrogenimonas thermophila* (Takai *et al.* 2004), *Lebetimonas acidiphila* (Takai *et al.* 2005), *Thioreductor micantisoli* (Nakagawa *et al.* 2005). Des séquences diverses d' ϵ -*Proteobacteria* ont été détectées dans la majorité des inventaires moléculaires décrivant la diversité microbienne des environnements hydrothermaux océaniques. Dans notre étude, l'analyse de la cheminée et de la culture en bioréacteur à 90°C a permis de détecter une diversité de séquences d' ϵ -*Proteobacteria*, la plupart étant affiliées à des clones environnementaux. Les ϵ -*Proteobacteria* n'ont pas été détectés dans les cultures en flacon, ce qui semble indiquer que le système de culture utilisé (culture continue en bioréacteur gas-lift) ait favorisé leur croissance à 90°C. Ces ϵ -*Proteobacteria* n'ont pas non plus été retrouvés à 60°C. Les microorganismes correspondant seraient donc hyperthermophiles. A ce jour, aucune des ϵ -*Proteobacteria* isolés n'est décrite comme étant capable de croissance à 90°C (culture pure en flacon). Malgré une variété de conditions expérimentales testées pour la réalisation de sous-cultures en flacon à partir d'échantillon de cultures d'enrichissement à 90°C (où les ϵ -*Proteobacteria* ont été détectés), aucune de ces souches n'a pu être isolée.

Diversité des γ - et δ -*Proteobacteria* (Figure 4)

A partir des cultures, une seule séquence de γ -*Proteobacteria* a été détectée dans le bioréacteur à 90°C, et est affiliée à des clones d'incultivés. L'ensemble des autres séquences se positionnant dans ces groupes provient de l'échantillon de cheminée. En particulier une diversité de séquences a été obtenue au sein des δ -*Proteobacteria* (*Desulfobacterium* sp., *Desulfovibrio* sp.), correspondant probablement à des microorganismes impliqués dans le cycle du soufre.

Diversité des *Bacteria*, hors *Proteobacteria* (Figure 5)

Des séquences obtenues à partir de l'échantillon de cheminée étaient affiliées à des séquences hydrothermales associées à des animaux et des sédiments, et appartenant aux *Verrucomicrobia* et aux CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*). La séquence EBB110 ne présente que 89% d'identité avec la séquence la plus proche en banque (clone hydrothermal de *Paralvinella palmiformis*) et 84% d'identité avec *Caldithrix abyssi*, organisme d'origine hydrothermale constituant une branche nouvelle parmi les phyla bactériens.

Des séquences affiliées à l'espèce *Caminicella sporogenes* ont été obtenues à 90°C à partir de la culture en bioréacteur, et à 60°C à partir des cultures en flacon et en bioréacteur. Cette espèce hétérotrophe et thermophile a été isolée d'un site hydrothermal de la ride Est-Pacifique (Alain *et al.* 2002).

Au sein des *Thermotogales*, des séquences affiliées aux genres *Marinitoga* et *Thermosipho* ont été obtenues. La température semble sélective pour les souches de *Marinitoga* cultivées puisque les séquences obtenues à partir de la culture à 90°C en bioréacteur sont étroitement apparentées à *M. piezophila*, alors que les séquences obtenues à partir des cultures en flacon et en bioréacteur à 60°C sont affiliées à *M. camini*, espèce également isolée de l'Atlantique. La souche correspondant à ces dernières séquences a pu être isolée à partir de la culture en bioréacteur et l'espèce nouvelle a été décrite. Elle présente une tolérance remarquable à la présence d'hydrogène dans la phase gazeuse, contrairement aux deux autres espèces de ce genre, d'où son nom *M. hydrogenitolerans*. D'autres *Thermotogales* ont été étudiées pour leur production d'hydrogène (Van Ooteghem *et al.* 2002). Cette souche pourrait dès lors présenter un intérêt biotechnologique certain du fait de cette caractéristique.

Des séquences affiliées à *Thermosipho* sp. ont également été obtenues à 60°C (flacon et bioréacteur). La souche correspondante a été isolée et correspond à une espèce nouvelle (une autre souche de cette espèce, isolée du même site, est en cours de description au laboratoire : '*Thermosipho keratinovorans*').

Des séquences affiliées au genre *Deferribacter* ont été détectées dans le bioréacteur à 60°C, et une souche notée 'DN' a été isolée : l'analyse de sa séquence d'ADNr 16S indique qu'il s'agit de l'espèce *D. abyssi*. La souche type a également été isolée du site Rainbow. Il s'agit d'une thermophile anaérobie, chimiolithoautotrophe facultative pouvant utiliser l'acétate comme source d'énergie. Elle utilise le soufre et le nitrate comme accepteur final d'électron, ce qui a également été montré pour la souche 'DN' que nous avons isolée dans cette étude.

Une autre souche autotrophe affiliée au genre *Thermodesulfator* a été détectée (clone 850) et isolée (souche T2R3) à partir de la culture en bioréacteur à 60°C. *T. indicus*

est la seule espèce de ce genre décrite: il s'agit d'une sulfato-réductrice isolée d'un site hydrothermal de l'Océan Indien (Moussard *et al.* 2004). Nous avons montré que la souche 'T2R3' isolée du bioréacteur était capable de croissance en autotrophie stricte par réduction des sulfates en H₂S.

Dans la culture d'enrichissement en continu obtenue à 60°C, des hétérotrophes et des autotrophes ont donc été obtenus en culture mixte. Les premiers utilisent certainement les sources de carbone organique du milieu apportées en continu, alors que les secondes utilisent vraisemblablement l'hydrogène comme donneur d'électron et le CO₂ comme source de carbone, ces deux composés étant des produits finaux du métabolisme fermentatif. Le schéma suivant peut être proposé pour expliquer l'utilisation des composants du milieu et des métabolites produits par les hétérotrophes assurant le développement des souches autotrophes détectées dans la culture d'enrichissement en bioréacteur à 60°C.

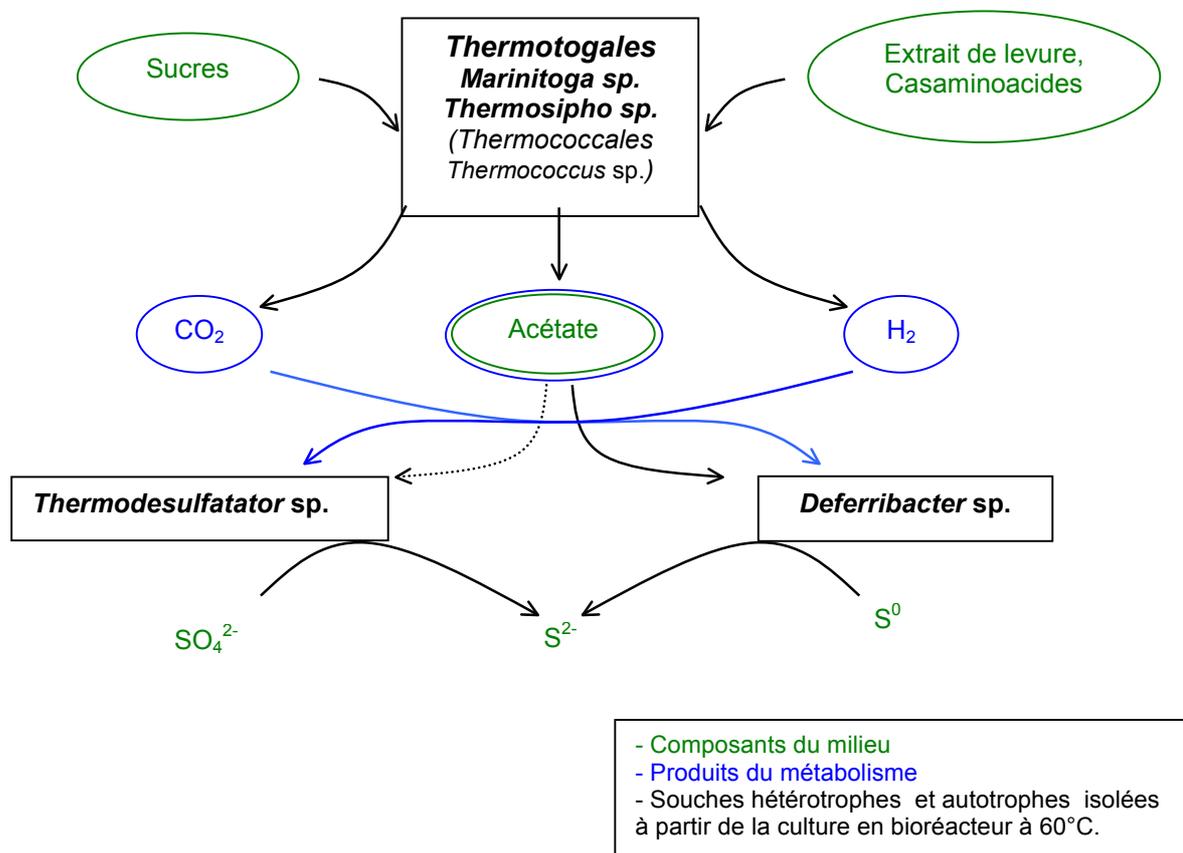


Figure 1 : Schéma présentant la consommation présumée des composants du milieu (sucres, substrats complexes, acétate, sulfate et soufre élémentaire) et la production des métabolites (CO₂, H₂ et acétate) par les microorganismes hétérotrophes (*Marinitoga sp.*, *Thermosipho sp.*, *Thermococcus sp.*), permettant d'expliquer le développement de souches autotrophes (*Thermodesulfatator sp.* et *Deferribacter sp.*) dans la culture d'enrichissement en bioréacteur à 60°C.

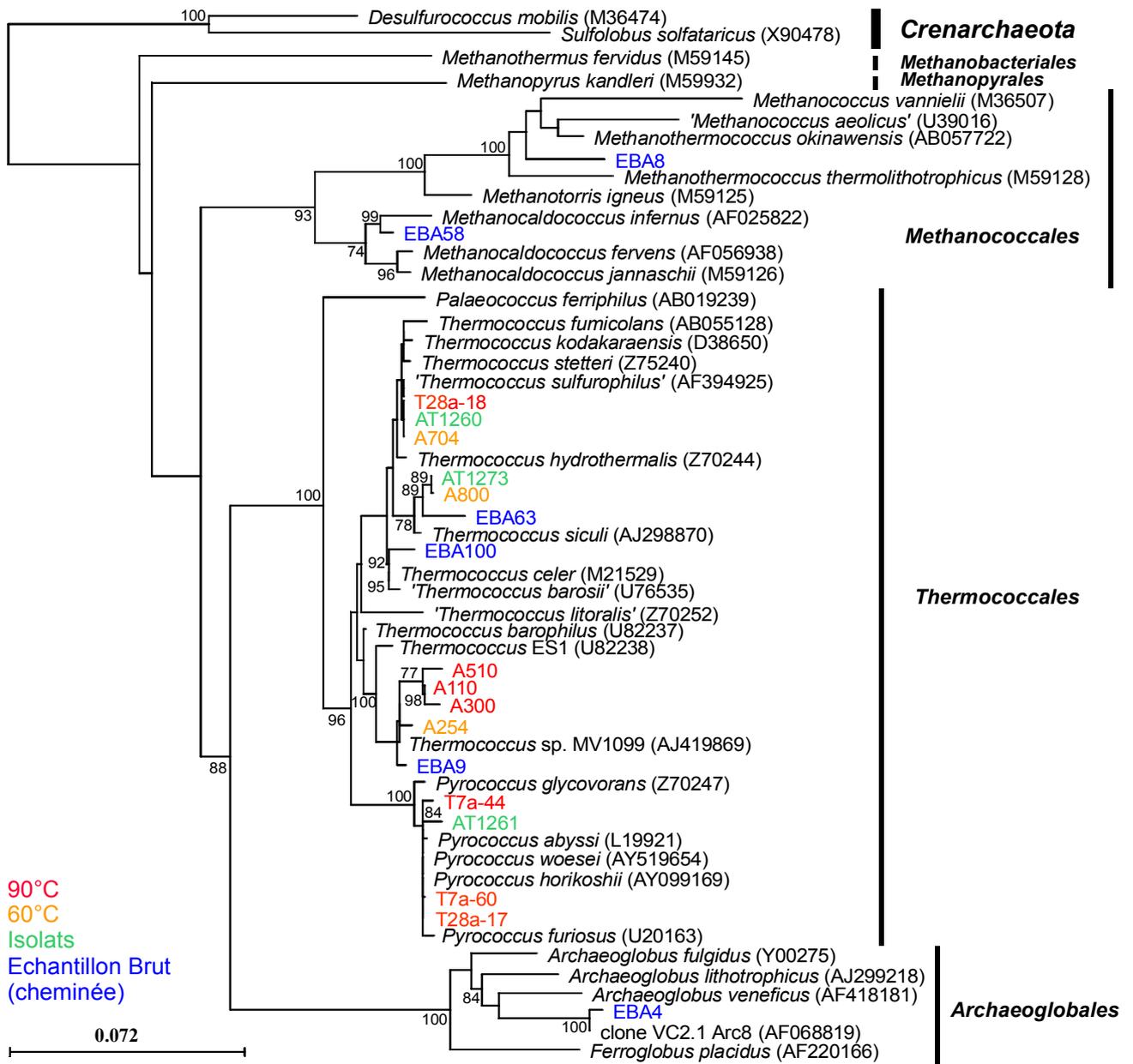


Figure 2 : Positionnement phylogénétique des séquences d'*Archaea* obtenues dans les différentes études: à partir de l'échantillon de cheminée, en culture d'enrichissement (flacon ou fermenteur) à 90°C et 60°C et en culture d'isolement. L'ensemble des séquences appartient au phylum des *Euryarchaeota*, excepté les deux séquences de *Crenarchaeota* utilisées comme outgroup. 652 paires de bases ont été analysées, en utilisant la méthode du Neighbour-joining, avec correction de Jukes et Cantor. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées sur l'arbre.

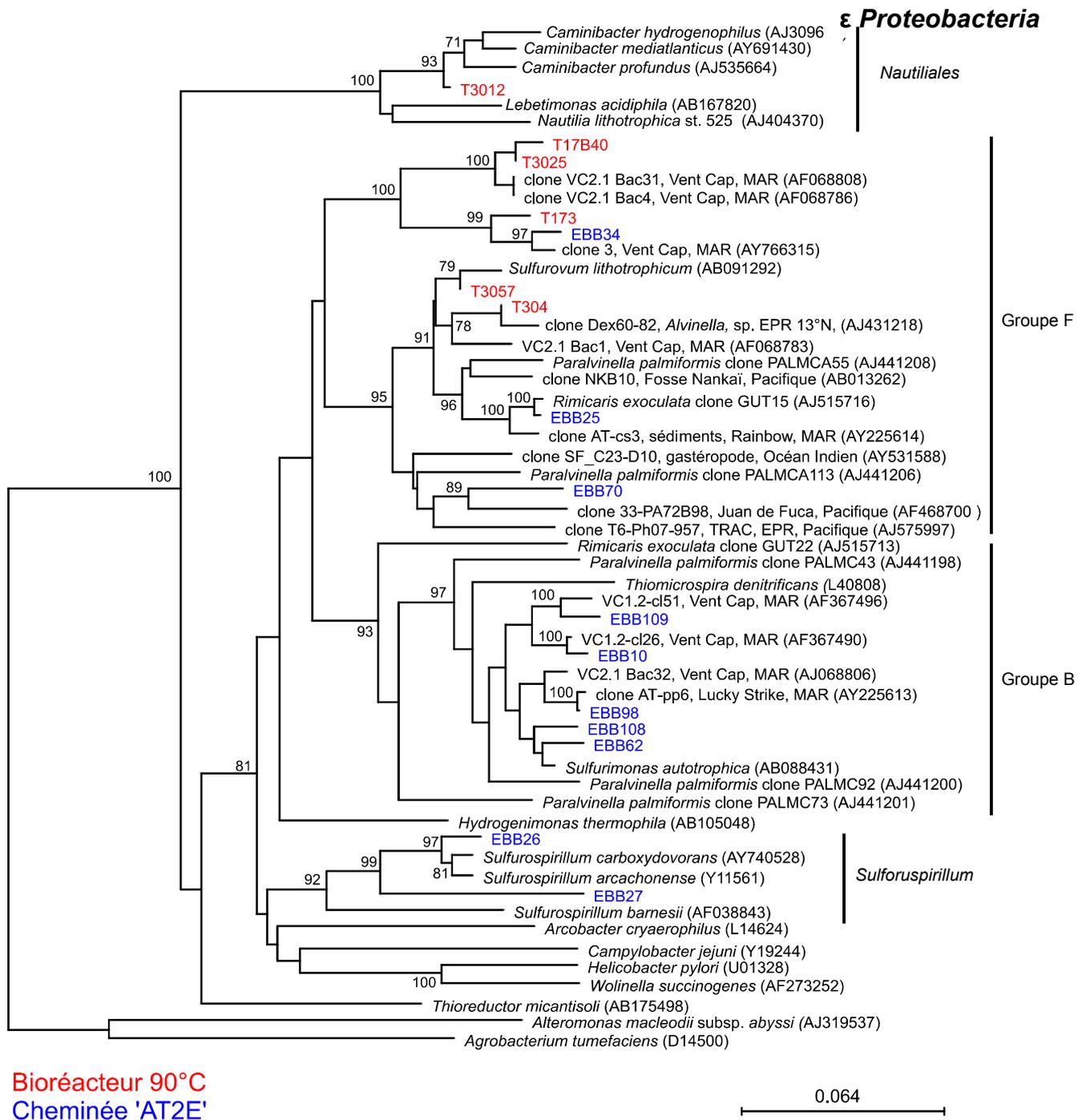


Figure 3 : Positionnement phylogénétique des séquences d' ϵ -*Proteobacteria* obtenues dans les différentes études: à partir de l'échantillon de cheminée, en culture d'enrichissement (fermenteur) à 90°C. Les séquences d'*Alteromonas macleodii* et d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été utilisées comme outgroup. La méthode du Neighbour-joining, avec correction de Jukes et Cantor, a été appliquée. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées sur l'arbre.

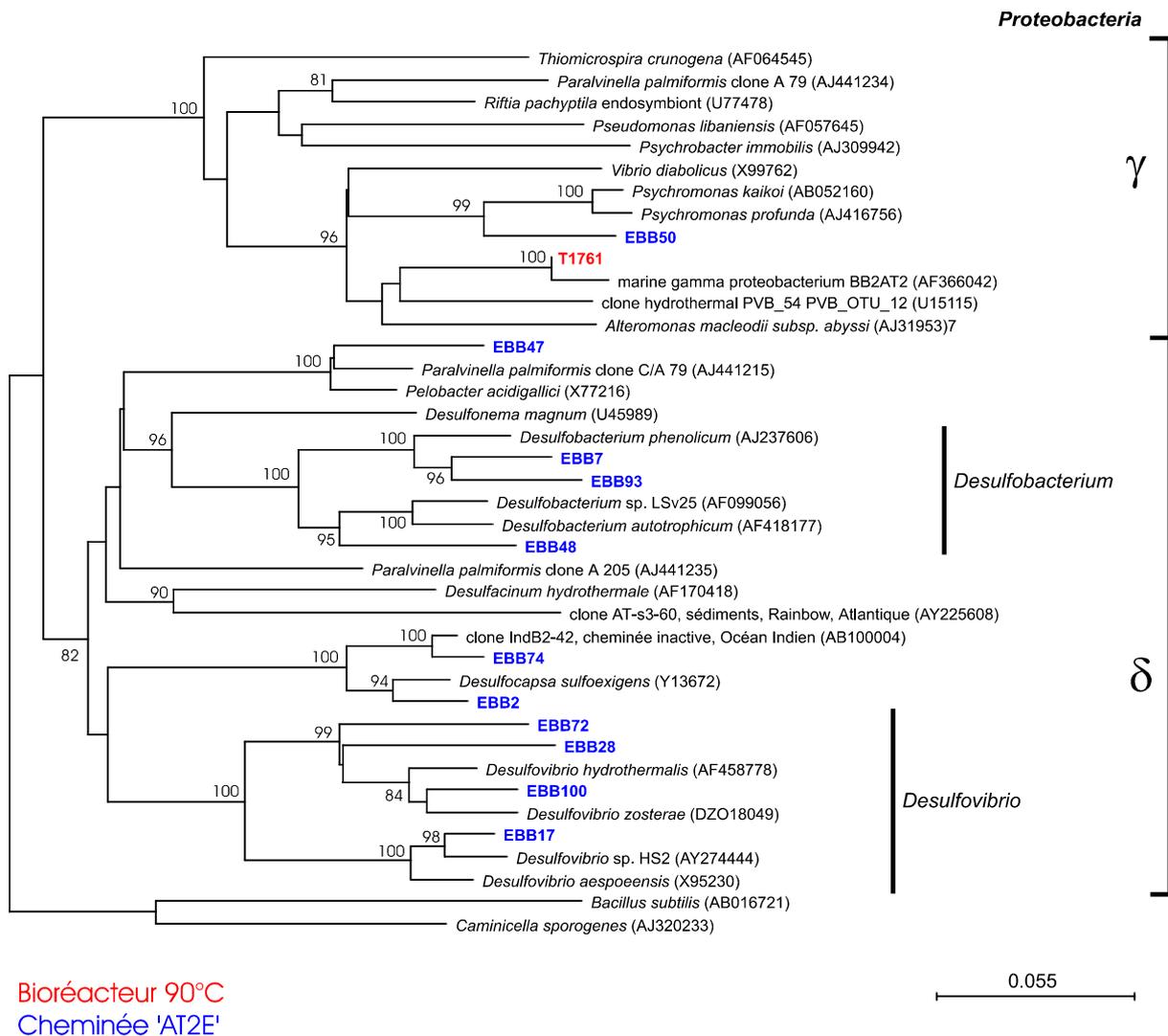


Figure 4 : Positionnement phylogénétique des séquences de γ - et δ -*Proteobacteria* obtenues dans les différentes études: à partir de l'échantillon de cheminée, en culture d'enrichissement (fermenteur) à 90°C. Les séquences de *Bacillus subtilis* et *Caminicella sporogenes* ont été utilisées comme outgroup. La méthode du Neighbour-joining, avec correction de Jukes et Cantor, a été appliquée. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées sur l'arbre.

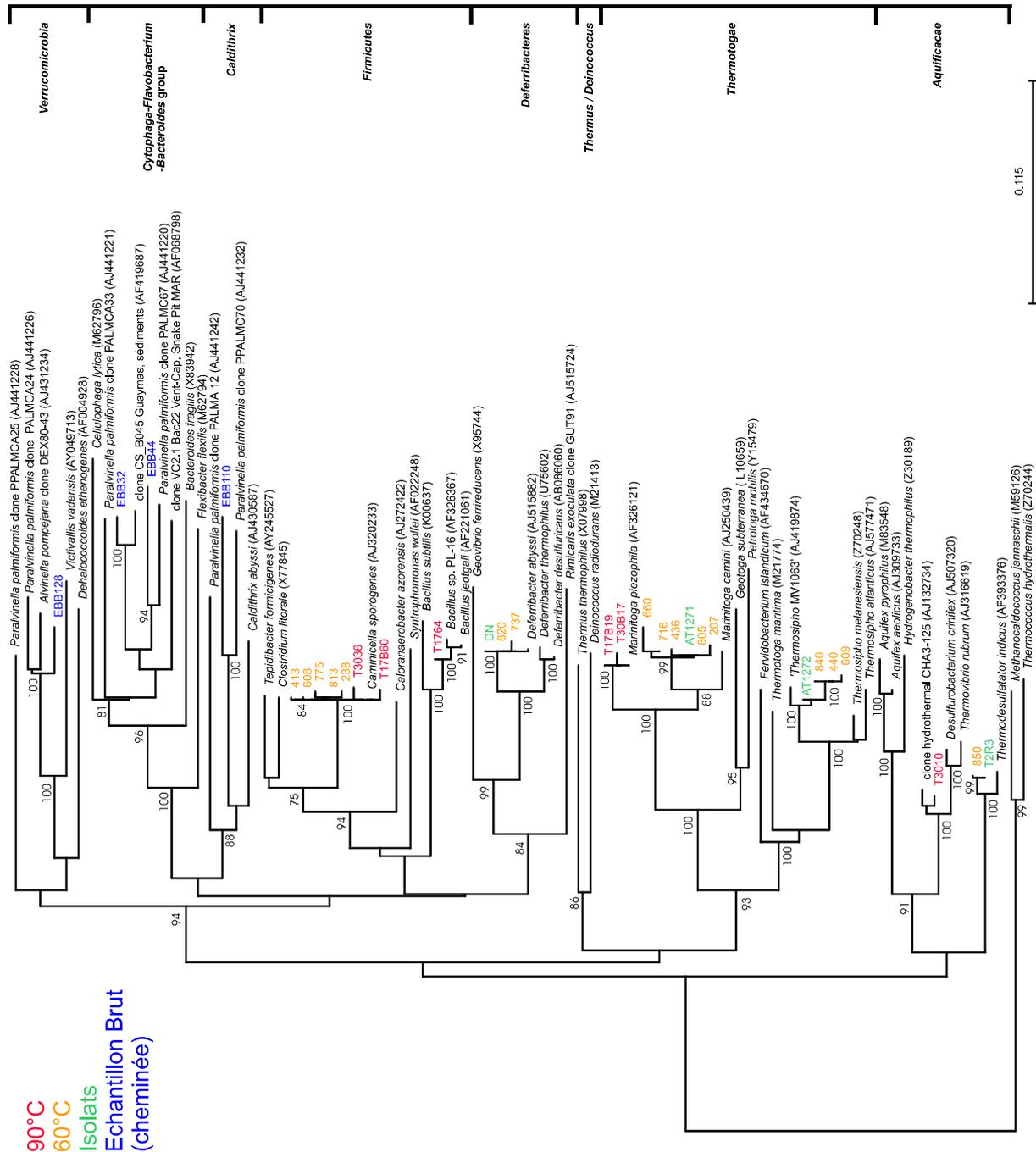


Figure 5: Positionnement phylogénétique des séquences d'ADNr 16S bactériens, hors *Proteobacteria*, obtenues dans les différentes études: à partir de l'échantillon de cheminée, en culture d'enrichissement (fermenteur) à 60°C et 90°C, ainsi que les séquences des microorganismes isolés. Les séquences archéennes de *Methanocaldococcus jannashii* et *Thermococcus hydrothermalis* ont été utilisées comme outgroup. La méthode du Neighbour-joining, avec correction de Jukes et Cantor, a été appliquée. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70 sont indiquées sur l'arbre.

Conclusion et perspectives

Les conditions extrêmes de température, de pH, de pression hydrostatique, de concentrations en métaux lourds font des sources hydrothermales océaniques profondes des modèles uniques pour l'étude de la biodiversité microbienne.

Le but de ce travail était l'analyse de la diversité microbienne d'un échantillon de cheminée prélevé sur le site hydrothermal Rainbow situé dans l'océan Atlantique, (i) par une approche moléculaire indépendante des cultures et (ii) par deux approches culturales ciblant l'enrichissement de thermophiles (60°C) et d'hyperthermophiles (90°C) sur un milieu complexe et en anaérobiose. Outre les cultures en batch (expériences en flacon), une nouvelle stratégie a été mise en œuvre : des cultures d'enrichissement en continu ont été réalisées sur plusieurs semaines dans un bioréacteur gas-lift. La diversité des populations cultivées dans chaque cas a été analysée à l'aide de différentes techniques moléculaires (DGGE, clonage, séquençage, FISH). Les cultures en bioréacteur ont permis l'isolement et la caractérisation de certaines souches originales.

Les études de diversité moléculaire pratiquées directement sur échantillon de cheminée sont peu nombreuses concernant les sites hydrothermaux de l'Atlantique. Récemment, Shrenk *et al* (2004) ont montré la présence d'*Archaea* (*Methanosarcinales*) dans une cheminée de carbonate du site Lost City qui présente des caractéristiques très particulières (i.e. fluides alcalins, jusqu'à pH 10). La plupart des inventaires moléculaires réalisés sur des sites de l'Atlantique portent sur la diversité microbienne associée (i) à des colonisateurs *in situ*, qui sélectionnent préférentiellement les microorganismes capables d'attachement et de colonisation rapide, ou (ii) à des animaux (Corre *et al.* 2001, Reysenbach *et al.* 2000, Zbinden & Cambon-Bonavita 2003). Nos résultats donnent une image de la diversité microbienne associée directement à un fumeur noir de la ride Medio-Atlantique. Les séquences que nous avons obtenues sont affiliées à des groupes ayant déjà été détectés dans l'écosystème hydrothermal océanique profond par le biais de clones environnementaux et/ou de microorganismes cultivés. Parmi les *Archaea*, nous n'avons pas mis en évidence de *Korarchaeota* ou de séquences des groupes crenarchéens d'incultivés tels que MG (Marine Group) ce qui pourrait indiquer une plus faible diversité phylogénétique des *Archaea* dans les écosystèmes hydrothermaux de l'Atlantique comparé à ceux du Pacifique.

La majorité des microorganismes obtenus dans les cultures d'enrichissement, hormis ceux du genre *Thermococcus*, n'ont pas été détectés dans l'échantillon de cheminée. A partir d'un échantillon de cheminée hydrothermale utilisé comme inoculum, les cultures mises en œuvre dans cette étude ont donc permis de décrire une fraction de la microflore thermophile cultivable dont les microorganismes étaient probablement peu représentés dans

l'échantillon initial. L'abaissement de la température de 90 à 60°C a permis d'étendre notre vision de la diversité des microorganismes thermophiles cultivables de la cheminée étudiée. Ainsi, les *ε-Proteobacteria* n'ont été détectés qu'à 90°C en bioréacteur alors que les genres bactériens *Thermosipho*, *Deferribacter* et *Thermodesulfator* n'ont été détectés qu'à 60°C. De plus, l'analyse moléculaire des populations enrichies a permis de mettre en évidence, à 90°C comme à 60°C, une plus large diversité microbienne en bioréacteur qu'en flacon. La réalisation de cultures d'enrichissement en continu dans le bioréacteur gas-lift s'avère donc être une technique performante pour cultiver des populations d'enrichissement diversifiées. Des microorganismes, proches de clones environnementaux ou de microorganismes hydrothermaux déjà décrits, ont été cultivés. La culture d'enrichissement en continu dans le bioréacteur semble aussi permettre la croissance de certains microorganismes dans des conditions différentes de celles décrites pour des souches pures cultivées en flacon. En effet, les espèces *C. sporogenes* et *M. piezophila*, décrites comme thermophiles modérées et incapable de croissance à 90°C, ont été détectées dans la culture en bioréacteur à 90°C. Bien que ces souches n'aient pu être isolées, il apparaît que leur croissance dans des conditions très nettement supérieures à celles décrites en flacon (i.e. 15°C) soit possible.

Les approches culturelles de cette étude nous ont permis d'accéder à une diversité phylogénétique et métabolique, incluant notamment des espèces hétérotrophes, autotrophes, sulfo-réductrices et sulfato-réductrices. L'isolement de plusieurs souches par sous-cultures en flacon a été réalisé avec succès, ce qui démontre la possibilité d'isoler des microorganismes enrichis en bioréacteur. L'expérience de la première culture nous a d'ailleurs servi à améliorer les conditions de stockage des échantillons de culture, d'une manière plus adaptée pour les expériences de sous-culture et d'isolement, ainsi que pour les analyses en FISH.

Le bioréacteur utilisé pour la réalisation de cultures d'enrichissement en continu a permis d'établir des cultures mixtes sur le 'long'-terme. Les outils moléculaires choisis se sont avérés adaptés au suivi d'une dynamique de population dans le bioréacteur au sein d'une telle culture, contrairement à un épuisement de la diversité. La DGGE a permis de mettre en évidence une diversité microbienne limitée, et les séquences obtenues étaient relativement courtes, et donc moins informatives que les séquences obtenues par clonage. La DGGE s'est révélée cependant être une méthode de choix pour accéder à la dynamique d'une population cultivée, en combinaison avec des clonages sur échantillons ponctuels qui ont donné une vision plus large de la diversité. En effet, si les clonages ont par exemple permis de détecter des membres de l'ordre des *Thermotogales* dans deux échantillons (7^e et 28^e jour) de la culture d'enrichissement en fermenteur à 90°C, c'est grâce à la technique de DGGE qu'il a été possible de montrer leur présence sur des longues périodes.

Les techniques moléculaires d'écologie microbienne sont pour l'heure essentiellement basées sur l'utilisation des séquences d'ARN ribosomiques dans un but d'identification des microorganismes d'un environnement. L'utilisation d'oligonucléotides plus spécifiques (e.g. d'un ordre ou d'un genre) permettrait de suivre plus précisément certaines populations microbiennes au sein d'une communauté. A l'avenir, des oligonucléotides ciblant des gènes codant pour des enzymes clés de certaines voies métaboliques permettraient de détecter dans une communauté des populations potentiellement associées à une fonction (méthanogénèse, méthanotrophie, sulfato-réduction etc.). Ces oligonucléotides peuvent être utilisés dans le cadre de différentes techniques moléculaires : la RT-PCR permettant la détection de population métaboliquement actives, la PCR quantitative permettant de quantifier les populations, le FISH utilisable pour la détection, le dénombrement et la détermination de la morphologie de certains microorganismes.

Le bioréacteur gas-lift s'avère donc être un outil prometteur pour l'étude d'une population en culture mixte, correspondant à une fraction de la communauté naturelle, en fonction des conditions expérimentales appliquées : dans notre cas, les conditions de culture choisies orientaient la croissance de microorganismes hyperthermophiles et thermophiles, hétérotrophes et anaérobies (éventuellement soufre réducteur). Outre les techniques classiques d'isolement par série de dilution ou sur boîte, l'utilisation d'outils performants (e.g. pinces optiques, micromanipulateurs) devrait permettre d'isoler les différents microorganismes enrichis. L'application de toutes autres conditions pourraient cibler des métabolismes beaucoup plus spécifiques tels que l'oxydation anaérobie de l'ammonium, ou l'oxydation anaérobie du méthane. Un des résultats inattendus de cette étude est l'obtention dans une même culture d'enrichissement d'hétérotrophes et d'autotrophes, dans des conditions ciblant préférentiellement la croissance d'hétérotrophes. L'utilisation de faibles voire très faibles concentrations en nutriments, constituant des conditions d'oligotrophie, pourrait être une stratégie efficace pour limiter la croissance des hétérotrophes et ainsi augmenter la diversité microbienne en accédant à de nouveaux microorganismes oligotrophes de l'écosystème hydrothermal.

Idéalement, les expériences devraient être menées dans la mesure du possible directement dans l'environnement par des enrichissements *in situ*. Ainsi, des matrices enrichies en nutriments ou des supports artificiels peuvent faire l'objet de colonisation *in situ*, en présence des facteurs de croissance et des conditions de l'environnement hydrothermal dont la simulation *in vitro* est délicate (Hobel 2004, Hobel *et al.* 2004). Des prélèvements d'eau *in situ*, mélange de fluide hydrothermal et d'eau de mer, pourrait être directement utilisée pour la réalisation de milieux d'enrichissement, ce qui pourrait favoriser la croissance de microorganismes encore 'incultivés' mais sans doute pas 'incultivables'. Pour ce faire,

l'utilisation de mini-fermenteurs à bord peut être envisagée. L'utilisation du fermenteur gas-lift offre de nouvelles perspectives dans l'exploration des communautés microbiennes des sources océaniques profondes. Il pourrait ainsi être utilisé pour tenter de mimer *in vitro* les conditions *in situ*. L'écosystème hydrothermal étant caractérisé par de forts gradients physico-chimiques en raison du mélange turbulent du fluide avec l'eau de mer après son émission, le bioréacteur pourrait notamment servir à étudier l'impact de perturbations physico-chimiques *in vitro* (pH, température, afflux de matière organique, etc.) sur le comportement de communautés microbiennes actives, en culture.

Bibliographie

A¹

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V. & Polz, M. F. (2004).** Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. *J Bacteriol* **186**, 2629-2635.
- Adams, M. W. W., Holden, J. F., Menon, A. L., Schut, G. J., Grunden, A. M., Hou, C., Hutchins, A. M., Jenney, F. E., Kim, C., Ma, K. S., Pan, G. L., Roy, R., Sapro, R., Story, S. V. & Verhagen, M. (2001).** Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **183**, 716-724.
- Alain, K., Marteinson, V. T., Miroshnichenko, M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Prieur, D. & Birrien, J. L. (2002a).** *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1331-1339.
- Alain, K., Olagnon, M., Desbruyeres, D., Page, A., Barbier, G., Juniper, S. K., Querellou, J. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2002b).** Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol* **42**, 463-476.
- Alain, K., Pignet, P., Zbinden, M., Quillevere, M., Duchiron, F., Donval, J. P., Lesongeur, F., Raguènes, G., Crassous, P., Querellou, J. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2002c).** *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1621-1628.
- Alain, K., Querellou, J., Lesongeur, F., Pignet, P., Crassous, P., Raguènes, G., Cuff, V. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2002d).** *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1317-1323.
- Alain, K., Rolland, S., Crassous, P., Lesongeur, F., Zbinden, M., Le Gall, C., Godfroy, A., Page, A., Juniper, S. K., Cambon-Bonavita, M.-A., Duchiron, F. & Querellou, J. (2003).** *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles* **7**, 361-370.
- Alain, K., Zbinden, M., Le Bris, N., Lesongeur, F., Quérellou, J., Gaill, F. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2004).** Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol* **6**, 227-241.
- Alazard, D., Dukan, S., Urios, A., Verhe, F., Bouabida, N., Morel, F., Thomas, P., Garcia, J.-L. & Ollivier, B. (2003).** *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 173-178.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. A. (1990).** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**, 762-770.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. & Guyot, J. P. (1999).** Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5464-5473.
- Andrä, S., Frey, G., Nitsch, M., Baumeister, W. & Stetter, K. O. (1996).** Purification and structural characterization of the thermosome from the hyperthermophilic archaeum *Methanopyrus kandleri*. *FEBS Lett* **379**, 127-131.
- Antoine, E., Cilia, V., Meunier, J.-R., Guezennec, J., Lesongeur, F. & Barbier, G. (1997).** *Thermosipho melanesiensis* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium belonging to the *Thermotogales*, isolated from deep-sea hydrothermal vent in the southern Pacific ocean. *Int J System Bacteriol* **47**, 1118-1123.
- Antoine, E., Guezennec, J., Meunier, J. R., Lesongeur, F. & Barbier, G. (1995).** Isolation and characterization of extremely thermophilic archaeobacteria related to the genus *Thermococcus* from deep-sea hydrothermal Guayamas basin. *Curr Microbiol* **31**, 186-192.
- Antoine, E., Rolland, J. L., Raffin, J. P. & Dietrich, J. (1999).** Cloning and over-expression in *Escherichia coli* of the gene encoding NADPH group III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus hydrothermalis*. *Eur J Biochem* **264**, 880-889.
- Arnold, H. P., Zillig, W., Ziese, U., Holz, I., Crosby, M., Utterback, T., Weidmann, J. F., Kristjanson, J. K., Klenk, H. P., Nelson, K. E. & Fraser, C. M. (2000).** A novel lipothrixvirus, SIFV, of the extremely thermophilic Crenarchaeon *Sulfolobus*. *Virology* **267**, 252-266.

B

- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. (1979).** Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev* **43**, 260-296.
- Barbier, G., Godfroy, A., Meunier, J.-R., Quérellou, J., Cambon, M.-A., Lesongeur, F., Grimont, P. A. D. & Raguènes, G. (1999).** *Pyrococcus glycovorans*, sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from the East Pacific Rise. *Int J System Bacteriol* **49**, 1829-1837.

¹ Les références bibliographiques citées dans les articles sont présentées à la fin de ces derniers et ne figurent pas dans cette partie.

- Baross, J. & Deming, J. W. (1985).** The role of bacteria in the ecology of black-smoker environments *Biol Soc Wash Bull* **6**, 355-371.
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. & Stetter, K. O. (1997).** *Pyrolobus fumarii*, gen. nov., sp. nov., represents a novel group of Archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**, 14-21.
- Bogdanov, Y., Sagalevitch, A., Chernayev, E., Ashadze, A., Gurvich, E., Lukaskin, V., Ivanov, G. & Peresyphkin, V. (1995).** A study of the hydrothermal field at 14°45'N on the Mid-Atlantic Ridge using the MIR submersibles. *BRIDGE News* **9**, 9-13.
- Brisbarre, N., Fardeau, M.-L., Cueff, V., Cayol, J.-L., Barbier, G., Cilia, V., Ravot, G., Thomas, P., Garcia, J.-L. & Ollivier, B. (2003).** *Clostridium caminithermale* sp. nov., a slightly halophilic and moderately thermophilic bacterium isolated from an Atlantic deep-sea hydrothermal chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1043-1049.
- Brock, T. D. 1978.** Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. New-York, USA: Springer-Verlag.
- Bruns, A. & Berthe-Corti, L. (1998).** *In situ* detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment suspensions with fluorescently labelled rRNA-directed oligonucleotide probes. *Microbiology* **144**, 2783-2790.
- Burggraf, S., Heyder, P. & Eis, N. (1997).** A pivotal Archaea group. *Nature* **385**, 780.
- Burggraf, S., Jannasch, H. W., Nicolaus, B. & Stetter, K. O. (1990).** *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *System Appl Microbiol* **13**, 24-28.
- Burggraf, S., Stetter, K. O., Rouvire, P. & Woese, C. R. (1991).** *Methanopyrus kandleri*: an archeal methanogen unrelated to all other known methanogens. *System Appl Microbiol* **14**, 346-351.
- C**
- Cambon-Bonavita, M.-A., Schmitt, P., Zieger, M., Flaman, J. M., Lesongeur, F., Raguene, G., Bindel, D., Frisch, N., Lakkis, Z., Dupret, D., Barbier, G. & Querellou, J. (2000).** Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic Archaea *Thermococcus fumicolans*. *Extremophiles* **4**, 215-225.
- Cambon-Bonavita, M.-A., Lesongeur, F., Pignet, P., Wery, N., Lambert, C., Godfroy, A., Querellou, J. & Barbier, G. (2003).** *Thermococcus atlanticus* sp. nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **7**, 101-109.
- Cambon-Bonavita, M.-A., Postec, A., Jean, J., Nadalig, T., Cambon, P., Etoubleau, J., Godfroy, A., Fouquet, Y. & Querellou, J. (2003).** Microbial diversity from black smoker samples collected in Rainbow deep-sea hydrothermal vent field, Mid-Atlantic Ridge: ecological implications. En préparation.
- Campbell, B. J. & Cary, S. C. (2001).** Characterization of a novel spirochete associated with the hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 110-117.
- Campbell, B. J., Stein, J. L. & Cary, S. C. (2003).** Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5070-5078.
- Campbell, J. B., Jeanthon, C., Kostka, J. E., Luther, G. W. & Cary, S. C. (2001).** Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the epsilon subdivision of the Proteobacteria enriched from *Alvinella pompejana* and deep sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4566-4572.
- Canganella, F. & Jones, W. J. (1994).** Microbial characterization of thermophilic Archaea isolated from the guaymas basin hydrothermal vent. *Curr Microbiol* **28**, 299-306.
- Canganella, F., Jones, W. J., Gambacorta, A. & Antranikian, G. (1997).** Biochemical and phylogenetic characterization of two novel deep-sea *Thermococcus* isolates with potentially biotechnological applications. *Arch Microbiol* **167**, 233-238.
- Canganella, F., Jones, W. J., Gambacorta, A. & Antranikian, G. (1998).** *Thermococcus guaymasensis* sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic Archaea isolated from the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *Int J System Bacteriol* **48**, 1181-1185.
- Cary, S., Cottrell, M., Stein, J., Camacho, F. & Desbruyeres, D. (1997).** Molecular identification and localization of filamentous symbiotic bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1124-1130.
- Casamayor, E. O., Schäfer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C. & Muyzer, G. (2000).** Identification and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lake : comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **66**, 499-508.
- Charlou, J. L., Donval, J. P., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P. & Holm, N. (2002).** Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14'N, MAR). *Chem Geol* **191**, 345-359.
- Chevaldonné, P. & Godfroy, A. (1997).** Enumeration of microorganisms from deep-sea hydrothermal chimney samples. *FEMS Microbiol Lett* **146**, 211-216.
- Chevaldonné, P. (1996).** Ecologie des cheminées hydrothermales actives. Thèse de Doctorat, Université d'Aix-Marseille II, France.
- Chevaldonné, P., Desbruyères, D. & Childress, J. J. (1992).** . . . and some even hotter. *Nature* **359**, 593-594.
- Cohen, G., Barbe, V., Flament, D., Galerpin, M., Heilig, R., Lecompte, O., Prieur, D., Poch, O., Querellou, J., Ripp, R., Thierry, J.-C., Van der Oost, J., Weissenbach, J., Zivanovic, Y. &**

- Forterre, P. (2003).** An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol* **47**, 1495-1512.
- Connon, S. A. & Giovannoni, S. J. (2002).** High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3878-3885.
- Corliss, J. B. & Ballard, R. D. (1977).** Oasis of life in the cold abyss. *National Geographic* **152**, 441-453.
- Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmont, J. M., Von Herzen, R. P., Ballard, R. D., Green, K., Williams D., Bainbridge, A., Crane, K. & Van Andel, T. H. (1979).** Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science* **203**, 1073-1083.
- Corre, E. (2000).** Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes: les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Corre, E., Reysenbach, A.-L. & Prieur, D. (2001).** ε-Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 329-335.
- Cottrell, M. T. & Cary, S. C. (1999).** Diversity of dissimilatory bisulfite reductase genes of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent polychaete Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1127-1132.
- Cowan, D. A. (2004).** The upper temperature for life - where do we draw the line? *Trends Microbiol* **12**, 58-60.
- Crosby, L. & Criddle, C. (2003).** Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques* **34**, 790-802.
- Dahllöf, I. & Kjelleberg, S. (2002).** Multivariate optimization of polymerase chain reaction for microbial community analysis. *Mar Biotechnol* **4**, 423-430.
- D**
- Desbruyères, D., Almeida, A., Biscoito, M., Comtet, T., Khripounoff, A., Le Bris, N., Sarradin, P. M. & Segonzac, M. (2000).** A review of the distribution of hydrothermal vent communities along the northern Mid-Atlantic Ridge: dispersal vs. environmental controls. *Hydrobiologia* **440**, 201-216.
- Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J.-C., Colaco, A., Comtet, T., Crassous, P., Fouquet, Y., Khripounoff, A., Le Bris, N., Olu, K., Riso, R., Sarradin, P.-M., Segonzac, M. & Vangriesheim, A. (2001).** Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep Sea Res Part I* **48**, 1325-1346.
- Desbruyères, D., Chevaldonne, P., Alayse, A.-M., Jollivet, D., Lallier, F. H., Jouin-Toulmond, C., Zal, F., Sarradin, P.-M., Cosson, R., Caprais, J.-C., Arndt, C., O'Brien, J., Guezennec, J., Hourdez, S., Riso, R., Gaill, F., Laubier, L. & Toulmond, A. (1998).** Biology and ecology of the "Pompeii worm" (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep Sea Res Part II* **45**, 383-422.
- Don, R., Cox, P., Wainwright, B., Baker, K. & Mattick, J. (1991).** "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acids Res* **19**, 4008.
- Douville, E., Charlou, J. L., Oelkers, E. H., Bienvénu, P., Jove Colon, C. F., Donval, J. P., Fouquet, Y., Prieur, D. & Appriou, P. (2002).** The rainbow vent fluids (36°14'N, MAR): the influence of ultramafic rocks and phase separation on trace metal content in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fluids. *Chem Geol* **184**, 37-48.
- Duffaud, G. D., D'Hennezel, O. B., Peek, A. S., Reysenbach, A. L. & Kelly, R. M. (1998).** Isolation and characterization of *Thermococcus barossii*, sp. nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a hydrothermal vent flange formation. *System Appl Microbiol* **21**, 40-49.
- Durand, P., Reysenbach, A.-L., Prieur, D. & Pace, N. (1993).** Isolation and characterization of *Thiobacillus hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic obligately chemolithotrophic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Fiji Basin. *Arch Microbiol* **159**, 1502-1506.
- E**
- Edwards, K. J., Rogers, D. R., Wirsén, C. O. & McCollom, T. M. (2003).** Isolation and characterization of novel psychrophilic, neutrophilic, Fe-oxidizing, chemolithoautotrophic alpha- and gamma-Proteobacteria from the deep sea. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2906-2913.
- Erauso, G. (1994).** Les *Thermococcales* du Bassin Nord-Fidjien, description d'une nouvelle espèce: *Pyrococcus abyssi* et caractérisation de son plasmide. Thèse de Doctorat en océanologie biologique, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Erauso, G., Reysenbach, A. L., Godfroy, A., Meunier, J. R., Crump, B., Partensky, F., Baross, J. A., Marteinsson, V., Barbier, G., Pace, N. R. & Prieur, D. (1993).** *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch Microbiol* **160**, 338-349.
- F**
- Fardeau, M.-L., Salinas, M. B., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Verhe, F., Cayol, J.-L., Patel, B. K. C., Garcia, J.-L. & Ollivier, B. (2004).** Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 467-474.

- Felsentein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evo.* **17**, 368-376.
- Felsentein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Ferris, M. J., Muyzer, G. & Ward, D. M. (1996).** Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined population inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol* **62**, 340-346.
- Fiala, G., Stetter, K. O., Jannasch, H. W., Langworthy, T. A. & Madon, J. (1986).** *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C. *System Appl Microbiol* **8**, 106-113.
- Fitch, W. M. (1971).** Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* **20**, 406-416.
- Flores, J. F., Fisher, C. R., Carney, S. L., Green, B. N., Freytag, J. K., Schaeffer, S. W. & Royer, W. E., Jr. (2005).** Sulfide binding is mediated by zinc ions discovered in the crystal structure of a hydrothermal vent tubeworm hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 2713-2718.
- Forster, P., Bergerat, A. & Lopez-Garcia, P. (1996).** The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic *Archaea*. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 237-248.
- Forster, P., Elie, C., Siuod, M. & Hamal, A. (1989).** Studies on DNA polymerase and topoisomerases in archaeobacteria. *Can J Microbiol* **35**, 228-233.
- Fouquet, Y. (1997).** Where are the large hydrothermal deposits in the oceans? *Phil Trans R Soc* **355**, 427-441.
- Fouquet, Y., Auclair, G., Cambon, P. & Etoubleau, J. (1988).** Geological setting and mineralogical and geochemical investigations on sulfide deposits near 13°N on the East-Pacific Rise. *Mar Geol* **84**, 145-178.
- Fouquet, Y., Charlou, J. L., Ondreas, H., Radford-Knoery, J., Donval, J. P., Douville, E., Apprioual, R., Cambon, P., Pellé, H., Landuré, J. Y., Normand, A., Poncevera, E., German, C., Parson, L., Barriga, F., Costa, I., Relvas, J., & Ribeiro, A. (1997).** Discovery and first submersible investigations on the Rainbow hydrothermal field on the MAR (36°14'N). *Eos Trans* **78**, 832.
- Frohlich, J. & Konig, H. (2000).** New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 567-572.
- G**
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996).** SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* **12**, 543-548.
- Gantelet, H. & Duchiron, F. (1998).** Purification and properties of a thermoactive and thermostable pullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*, a hyperthermophilic archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *Appl Microbiol Biotech* **49**, 770-777.
- Gantelet, H., Ladrat, C., Godfroy, A., Barbier, G. & Duchiron, F. (1998).** Characteristics of pullulanases from extremely thermophilic archaea isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Biotech Lett* **20**, 819-823.
- Geslin, C., Le Romancer, M., Erauso, G., Gaillard, M., Perrot, G. & Prieur, D. (2003a).** PAV1, the first virus-like particle isolated from a hyperthermophilic Euryarchaeote, *Pyrococcus abyssi*. *J Bacteriol* **185**, 3888-3894.
- Geslin, C., Le Romancer, M., Gaillard, M., Erauso, G. & Prieur, D. (2003b).** Observation of virus-like particles in high temperature enrichment cultures from deep-sea hydrothermal vents. *Res Microbiol* **154**, 303-307.
- Girguis, P. R., Orphan, V. J., Hallam, S. J. & DeLong, E. F. (2003).** Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic *Archaea* in a continuous-flow bioreactor. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5472-5482.
- Godfroy, A., Lesongeur, F., Raguénès, G., Quérellou, J., Antoine, E., Meunier, J.-R., Guezennec, J. & Barbier, G. (1997).** *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *Int J System Bacteriol* **47**, 622-626.
- Godfroy, A., Meunier, J.-R., Guezennec, J., Lesongeur, F., Raguénès, G., Rimbault, A. & Barbier, G. (1996).** *Thermococcus fumicolans* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeum isolated from deep-sea hydrothermal vent in North Fiji basin. *Int J System Bacteriol* **46**, 1113-1119.
- Godfroy, A., Raven, N. D. H. & Sharp, R. J. (2000).** Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 127-132.
- Gold, T. (1992).** The deep, hot biosphere. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 6045-6049.
- Gonzalez, J. M., Kato, C. & Horikoshi, K. (1995).** *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Arch Microbiol* **164**, 159-164.
- Gonzalez, J. M., Masuchi, Y., Robb, F. T., Ammeramn, J. W., Maeder, D. L., Yanagibayashi, M., Tamaoka, J. & Kato, C. (1998).** *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**, 123-130.
- Gonzalez-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E. O., Amann, R. & Amils, R. (2003).** Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4853-4865.
- Gotz, D., Banta, A., Beveridge, T. J., Rushdi, A. I., Simoneit, B. & Reysenbach, A. L. (2002).** *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1349-1359.

- Graves, P. R. & Haystead, T. A. J. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 39-63.
- Grote, R., Li, L. N., Tamaoka, J., Kato, C., Horikoshi, K. & Antranikian, G. (1999). *Thermococcus siculi* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Mid-Okinawa Trough. *Extremophiles* **3**, 55-62.
- ## H
- Haddad, A., Camacho, F., Durand, P. & Cary, S. C. (1995). Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1679-1687.
- Harmsen, H., Prieur, D. & Jeanthon, C. (1997a). Group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify thermophilic bacteria in marine hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4061-4068.
- Harmsen, H. J. M., Prieur, D. & Jeanthon, C. (1997b). Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2876-2883.
- Hedrick, D. B., Pledger, R. D., White, D. C. & Baross, J. A. (1992). *In situ* microbial ecology of hydrothermal vent sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **101**, 1-10.
- Hobel, C. F. V. (2004). Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. Thesis, Faculty of Sciences, Reykjavik, Iceland.
- Hobel, C. F. V., Marteinson, V. T., Hauksdóttir, S., Fridjónsson, Ó. H., Skírnisdóttir, S., Hreggvidsson, G. Ó. & Kristjánsson, J. K. (2004). Use of low nutrient enrichments to access novel amylase genes in silent diversity of thermophiles. *W J Microbiol Biotech* **20**, 801-809.
- Holben, W. E., Jansson, J. K., Chelm, B. K. & Tiedje, J. M. (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol* **54**, 703-711.
- Holden, J. F. & Baross, J. A. (1995). Enhanced thermotolerance by hydrostatic pressure in the deep-sea hyperthermophilic *Pyrococcus* strain ES4. *FEMS Microbiol Ecol* **18**, 27-34.
- Holden, J. F., Takai, K., Summit, M., Bolton, S., Zyskowski, J. & Baross, J. A. (2001). Diversity among three novel groups of hyperthermophilic deep-sea *Thermococcus* species from three sites in the northeastern Pacific Ocean. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 51-60.
- Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyschkony, I., Rachel, R. & Stetter, K. (2000a). *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic *Archaea*, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 2093-2100.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. & Stetter, K. O. (2002a). A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63-67.
- Huber, H., Hohn, M. J., Stetter, K. O. & Rachel, R. (2003a). The phylum *Nanoarchaeota*: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Res Microbiol* **154**, 165-171.
- Huber, H., Jannash, H., Reinhard, R., Fuchs, T. & Stetter, K. O. (1997). *Archaeoglobus veneficus*, sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers. *System Appl Microbiol* **20**, 374-380.
- Huber, J. A., Butterfield, D. A. & Baross, J. A. (2002). Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge seafloor habitat. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1585-1594.
- Huber, J. A., Butterfield, D. A. & Baross, J. A. (2003b). Bacterial diversity in a seafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiol Ecol* **43**, 393-409.
- Huber, R., Eder, W., Heldwein, S., Wanner, G., Huber, H., Rachel, R. & Stetter, K. O. (1998). *Thermocrinis ruber* gen. nov., sp. nov., a pink-filament-forming hyperthermophilic bacterium isolated from Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3576-3583.
- Huber, R., Huber, H. & Stetter, K. O. (2000c). Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 615-623.
- Huber, R., Kurr, M., Jannasch, K. O. & Stetter, K. O. (1989). A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C. *Nature* **342**, 833-834.
- Huber, R., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B. & Stetter, K. O. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of uniquely extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch Microbiol* **144**, 324-333.
- Huber, R., Stöhr, J., Honenhaus, S., Rachel, R., Burggraf, S., Jannasch, H. W. & Stetter, K. O. (1995). *Thermococcus chitonophagus* sp. nov., a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal environment. *Arch Microbiol* **164**, 255-264.
- Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* **3**, 1-8.
- ## I
- Inagaki, F., Takai, K., Kobayashi, H., Neilson, K. H. & Horikoshi, K. (2003). *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing ϵ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1801-1805.
- Inagaki, F., Takai, K., Neilson, K. H. & Horikoshi, K. (2004). *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -*Proteobacteria* isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1477-1482.

J

- Jannasch, H. W. & Wirsén, C. O. (1979).** Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *Bioscience* **29**, 592-598.
- Jannasch, H. W. (1985).** The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents. *Proc R Soc Lond B* **225**, 277-297.
- Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Molyneux, S. J. & Langworthy, T. A. (1988).** Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1203-1209.
- Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Molyneux, S. J. & Langworthy, T. A. (1992).** Comparative physiological studies on hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3472-3481.
- Jannasch, H. W., Wirsén, C. O., Nelson, D. & Robertson, L. (1985).** *Thiomicrospira crunogena* sp. nov. a colorless sulfur-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J System Bacteriol* **35**, 422-424.
- Jannasch, H. & Mottl, M. (1985).** Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* **229**, 717-725.
- Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cuffe, V., Banta, A., Reysenbach, A. L. & Prieur, D. (2002).** *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 765-772.
- Jeanthon, C., L'Haridon, S., Reysenbach, A., Vernet, M., Messner, P., Sleytr, U. & Prieur, D. (1998).** *Methanococcus infernus* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J System Bacteriol* **48**, 913-919.
- Jeanthon, C., S, L. H., Reysenbach, A. L., Corre, E., Vernet, M., Messner, P., Sleytr, U. B. & Prieur, D. (1999).** *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213 as *Methanococcus fervens* sp. nov. *Int J System Bacteriol* **49**, 583-589.
- Jolivet, E., Corre, E., L'Haridon, S., Forterre, P. & Prieur, D. (2004).** *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic Archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles* **8**, 219-227.
- Jolivet, E., L'Haridon, S., Corre, E., Forterre, P. & Prieur, D. (2003).** *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 847-851.
- Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. (1983).** *Methanococcus jannaschii* sp. nov. an extremely thermophilic methanogen

from a submarine hydrothermal vent. *Arch Microbiol* **136**, 254-261.

- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969).** Evolution of protein molecules. In Munro H N, (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, New York: Academic Press, p 21-132.
- Juniper, S. K., Cambon, M.-A., Lesongeur, F. & Barbier, G. (2001).** Extraction and purification of DNA from organic rich subsurface sediments (ODP Leg 169S). *Mar Geol* **174**, 241-247.

K

- Karl, D. M. (1995).** Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities, p. 35-124. In D. M. Karl (ed.), *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*. CRC Press.
- Kashefi, K. & Lovley, D. R. (2003).** Extending the upper temperature limit for life. *Science* **301**, 934.
- Kashefi, K., Holmes, D. E., Baross, J. A. & Lovley, D. R. (2003).** Thermophily in the *Geobacteraceae*: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic member of the *Geobacteraceae* from the "Bag City" hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2985-2993.
- Kashefi, K., Tor, J. M., Holmes, D. E., Gaw Van Praagh, C. V., Reysenbach, A. L. & Lovley, D. R. (2002).** *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 719-728.
- Kaye, J. Z., Marquez, M. C., Ventosa, A. & Baross, J. A. (2004).** *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 499-511.
- Kelley, D. S., Karson, J. A., Blackman, D. K., Fruh-Green, G. L., Butterfield, D. A., Lilley, M. D., Olson, E. J., Schrenk, M. O., Roe, K. K. & Lebon, G. T. (2001).** An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30°N. *Nature* **412**, 145-149.
- Kimura, M. (1968).** Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**, 624-626.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- Kowalchuk, G. A., Bodelier, P. L. E., Heilig, G. H. J., Stephen, J. R. & Laanbroek, H. J. (1998).** Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiol Ecol* **27**, 339-350.
- Krahe, M., Antranikian, G. & Märkl, H. (1996).** Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 217-285.
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H. W., Fricke, H., Trincone, A., Kristjansson, J. K. & Stetter, K. O. (1991).** *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of

- hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch Microbiol* **156**, 239-247.
- Kwak, Y. S., Kobayashi, T., Akiba, T., Horikoshi, K. & Kim, Y. B. (1995).** A hyperthermophilic sulfur-reducing Archaeobacterium, *Thermococcus* sp. DT1331, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Biosci Biotech Biochem* **59**, 1666-1669.
- ## L
- Laksanalamai, P., Maeder, D. L. & Robb, F. T. (2001).** Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **183**, 5198-5202.
- Lamosa, P., Martins, L. O., Da Costa, M. S. & Santos, H. (1998).** Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3591-3598.
- Lane, D., Stahl, D., Olsen, G. & Pace, N. R. (1985).** Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Proc Biol Soc Wash* **6**, 389-400.
- Leadbetter, J. R. (2003).** Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol* **6**, 274-281.
- Leclerc, M., Delbes, C., Moletta, R. & Godon, J.-J. (2001).** Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiol Ecol* **34**, 213-220.
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K.-H. & Wagner, M. (1999).** Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography: a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1289-1297.
- Legin, E., Ladrat, C., Godfroy, A., Barbier, G. & Duchiron, F. (1998).** Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. Some properties of a thermostable alpha-glucosidase. *C R Acad Sci Paris* **320**, 893-898.
- Lepage, E., Marguet, E., Geslin, C., Matte-Tailliez, O., Zillig, W., Forterre, P. & Tailliez, P. (2004).** Molecular diversity of new *Thermococcales* isolates from a single area of hydrothermal deep-sea vents as revealed by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1277-1286.
- Leveque, E., Haye, B. & Belarbi, A. (2000).** Cloning and expression of an alpha-amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 67-71.
- L'Haridon, S., Cilia, V., Messner, P., Raguene, G., Gambacorta, A., Sleytr, U. B., Prieur, D. & Jeanthon, C. (1998).** *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J System Bacteriol* **48**, 701-711.
- L'Haridon, S., Reysenbach, A.-L., Banta, A., Messner, P., Schumann, P., Stackebrandt, E. & Jeanthon, C. (2003).** *Methanocaldococcus indicus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1931-1935.
- Longnecker, K. & Reysenbach, A.-L. (2001).** Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of ϵ -*Proteobacteria* to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 287-293.
- Lonsdale, P. (1977).** Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Res* **24**, 857-863.
- López-García, P., Duperron, S., Philippot, P., Foriel, J., Susini, S. and Moreira, D. (2003).** Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilon-proteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **5**, 961-976.
- Lopez-Garcia, P., Gaill, F. & Moreira, D. (2002).** Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environ Microbiol* **4**, 204-215.
- Lowell, R. P. & Rona, P. A. (1995).** Seafloor hydrothermal systems driven by the serpentinization of peridotite. *Geophys Res Lett* **29**, 327-352.
- ## M
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. 2003.** Brock, Biology of Microorganisms, 10th ed. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2003).** Potential genomic determinants of hyperthermophily. *Trends Genet* **19**, 172-176.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962).** Determination of the base composition of desoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**, 109-118.
- Marteinsson, V. T., Birrien, J. L. & Prieur, D. (1997).** *In situ* enrichment and isolation of the thermophilic microorganisms from deep-sea vent environments. *Can J Microbiol* **43**, 694-697.
- Marteinsson, V. T., Birrien, J. L., Jeanthon, C. & Prieur, D. (1996).** Numerical taxonomic study of thermophilic *Bacillus* isolated from three geographical separated deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiol Ecol* **21**, 255-266.
- Marteinsson, V. T., Birrien, J. L., Raguene, G., Da Costa, M. S. & Prieur, D. (1999a).** Isolation and characterization of *Thermus thermophilus* Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **3**, 247-251.
- Marteinsson, V. T., Birrien, J. L., Reysenbach, A. L., Vernet, M., Marie, D., Gambacorta, A., Messner, P., Sleytr, U. B. & Prieur, D. (1999b).** *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J System Bacteriol* **49**, 351-359.

- Marteinsson, V. T., Birrien, J.-L., Kristjansson, J. K. & Prieur, D. (1995). First isolation of thermophilic aerobic non-sporulating heterotrophic bacteria from deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiol Ecol* **18**, 163-174.
- McDougald, D., Rice, S. A., Weichart, D. & Kjelleberg, S. (1998). Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol Ecol* **25**, 1-9.
- Miroshnichenko, M. L. (2004). Thermophilic microbial communities of deep-sea hydrothermal vents. *Microbiology* **73**, 1-13.
- Miroshnichenko, M. L., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Pimenov, N. V., Tourova, T. P., Antipov, A. N., Spring, S., Stackebrandt, E. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2003a). *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 323-329.
- Miroshnichenko, M. L., Kostrikina, N. A., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Hippe, H., Stackebrandt, E. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2002). *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing epsilon-proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1299-1304.
- Miroshnichenko, M. L., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Antipov, A. N., Kostrikina, N. A., Tindall, B. J., Schumann, P., Spring, S., Stackebrandt, E. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2003b). *Oceanithermus profundus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, facultatively chemolithoheterotrophic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 747-752.
- Miroshnichenko, M. L., L'Haridon, S., Nercessian, O., Antipov, A. N., Kostrikina, N. A., Tindall, B. J., Schumann, P., Spring, S., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E. A. & Jeanthon, C. (2003b). *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Thermaceae* from a deep-sea hot vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1143-1148.
- Miroshnichenko, M. L., L'Haridon, S., Schumann, P., Spring, S., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Jeanthon, C. & Stackebrandt, E. (2004). *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of *Nautiliales* ord. nov. within the class '*Epsilonproteobacteria*', isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 41-45.
- Miroshnichenko, M. L., Slobodkin, A. I., Kostrikina, N. A., L'Haridon, S., Nercessian, O., Spring, S., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E. A. & Jeanthon, C. (2003c). *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1637-1641.
- Mori, K., Kakegawa, T., Higashi, Y., Nakamura, K.-i., Maruyama, A. & Hanada, S. (2004). *Oceanithermus desulfurans* sp. nov., a novel thermophilic, sulfur-reducing bacterium isolated from a sulfide chimney in Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1561-1566.
- Moussard, H., L'Haridon, S., Tindall, B. J., Banta, A., Schumann, P., Stackebrandt, E., Reysenbach, A.-L. & Jeanthon, C. (2004). *Thermodesulfator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 227-233.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C. & Karl, D. M. (1994). Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol* **60**, 871-879.
- Moyer, C. L., Tiedje, J. M., Dobbs, F. C. & Karl, D. M. (1998). Diversity of deep-sea hydrothermal vent *Archaea* from Loihi Seamount, Hawaii. *Deep Sea Res Part II* **45**, 303-317.
- Moyer, C., Dobbs, F. & Karl, D. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1555-1562.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**, 3217-322.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. & Wawer, C. (1997). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology, In A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 1-27.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.

N

- Nakagawa, S., Inagaki, F., Takai, K., Horikoshi, K. & Sako, Y. *Thioreductor micantisoli* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, sulfur-reducing chemolithoautotroph within the epsilon-*Proteobacteria* isolated from the hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol*. (sous presse).
- Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K. & Sako, Y. (2003). *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 863-869.
- Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K. & Sako, Y. (2004). *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 329-335.

- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, L. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Venter, J. C. & Fraser, C. M. (1999). Evidence for lateral gene transfer between *Archaea* and *Bacteria* from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-329.
- Nercessian, O., Bienvenu, N., Moreira, D., Prieur, D. & Jeanthon, C. (2005). Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environ Microbiol* **7**, 118-132.
- Nercessian, O., Prokofeva, M., Lebedinski, A., L'Haridon, S., Cary, C., Prieur, D. and Jeanthon, C. (2004). Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for detecting cultured and uncultured archaeal lineages in high-temperature environments. *Environ Microbiol* **6**, 170-182.
- Nercessian, O., Reysenbach, A.-L., Prieur, D. & Jeanthon, C. (2003). Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). *Environ Microbiol* **5**, 492-502.
- O**
- Ollivier, B. & de Macario, E. C. (2004). Subcommittee on the taxonomy of methanoarchaea: minutes of the closed meeting, 19 May 2003, Washington, DC, USA. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 289.
- P**
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.
- Palleroni, N. J. (1997). Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**, 3-19.
- Pernthaler, A. & Amann, R. (2004). Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5426-5433.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. (2002). Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3094-3101.
- Philippe, H. (2000). Long branch attraction and protist phylogeny. *Appl Environ Microbiol* **51**, 307-316.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., Marsic, D., Beg, A. K. & Garriott, O. K. "*Thermococcus thioeducens*" sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. (non publié).
- Pinar, G., Saiz Jimenez, C., Schabereiter Gurtner, C., Blanco Varela, M. T., Lubitz, W. & Rolleke, S. (2001). Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Ecol* **37**, 45-54.
- Pledger, R. J. & Baross, J. A. (1989). Characterization of an extremely thermophilic archaeobacterium isolated from a black smoker polychaete (*Paralvinella* sp.) at the Juan de Fuca Ridge. *System Appl Microbiol* **12**, 249-256.
- Pledger, R. J. & Baross, J. A. (1991). Preliminary description and nutritional characterization of a chemoorganotrophic archaeobacterium growing at temperature up to 110°C isolated from a submarine hydrothermal vent environment. *J Gen Microbiol* **137**, 203-211.
- Pley, U., Schipka, J., Gambacorta, A., H.W., J., Fricke, H., Rachel, R. & Stetter, K. O. (1991). *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C. *System Appl Microbiol* **14**, 245-253.
- Polz, M. F. & Cavanaugh, C. M. (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7232-7236.
- Postec, A., Pignet, P., Cuffe-Gauchard, V., Schmitt, A., Querellou, J. & Godfroy, A. (2005). Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media. *Res Microbiol* **156**, 82-87.
- Powers, E. (1995). Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3756-3758.
- Prieur, D. & Marteinsson, V. T. (1998). Prokaryotes living under elevated hydrostatic pressure. *Biochem Eng Biotech* **61**, 23-25.
- Q**
- Quérellou, J. (1999). Clonage, analyse des gènes d'ADN polymérase et des intéines d'isolats de la famille des *Thermococcales*. Applications taxonomiques et biotechnologiques. Doctorat d'Université Paris XI -Orsay.
- Querellou, J., Alain, K. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2001). Thermophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Vie Milieu* **51**, 161-172.
- R**
- Raguènes, G. H. C., Peres, A., Ruimy, R., Pignet, P., Christen, R., Loaec, M., Rougeaux, H., Barbier, G. & Guezennec, J. G. (1997). *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J Appl Microbiol* **82**, 422-430.
- Raguènes, G., Cambon-Bonavita, M.-A., Lohier, J.-F., Boisset, C. & Guézennec, J. (2003). A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an alteromonas isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Curr Microbiol* **46**, 448-452.

- Raguénès, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P. & Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus*, sp. nov. a new polysaccharide-secreting organisms isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychate annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J System Bacteriol* **47**, 989-995.
- Raguénès, G., Meunier, J. R., Antoine, E., Godfroy, A., Caprais, J. C., Lesongeur, F., Guezennec, J. & Barbier, G. (1995). Biodiversité d'Archaea hyperthermophiles de sites hydrothermaux du Pacifique oriental. *C R Acad Sci Paris* **318**, 395-402.
- Raguénès, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G. & Guezennec, J. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl Environ Microbiol* **62**, 67-73.
- Ramade, F. 1993. Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des Sciences de l'Environnement. Ediscience International, Paris.
- Ramakrishnan, V., Verhagen, M. & Adams, M. (1997). Characterization of Di-myo-inositol-1,1(p₁m₁)-phosphate in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 347-350.
- Raven, N. D. H. & Sharp, R. J. (1997). Development of defined and minimal media for the growth of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* Vc1. *FEMS Microbiol Lett* **146**, 135-141.
- Raven, N., Ladwa, N. & Sharp, R. (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**, 263-267.
- Reysenbach, A.-L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a Mid-Atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3798-3806.
- Rieley, G., Dover, C. L. V., Hedrick, D. B. & Eglinton, G. (1999). Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: a combined lipid abundance/stable isotope approach. *Mar Biol* **133**, 495 - 499.
- Rodriguez-Valera, F. (2004). Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol Lett* **231**, 153-158.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J. & Goodman, R. M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2541-2547.
- Rossello Mora, R. & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 39-67.
- Ruby, E. G. & Jannasch, H. W. (1982). Physiological characteristics of *Thiomicrospira* sp. strain L12 isolated from deep-sea hydrothermal vents. *J Bacteriol* **149**, 161-165.
- S**
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Sako, Y., Nakagawa, S., Takai, K. & Horikoshi, K. (2003). *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 59-65.
- Santos, H. & Da Costa, M. S. (2002). Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ Microbiol* **4**, 501-509.
- Scholz, S., Wolff, S. & Hensel, R. (1998). The biosynthesis pathway of di-myo-inositol-1,1'-phosphate in *Pyrococcus woesei*. *FEMS Microbiol Lett* **168**, 37-42.
- Schrenk, M. O., Kelley, D. S., Bolton, S. A. & Baross, J. A. (2004). Low archaeal diversity linked to seafloor geochemical processes at the Lost City Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **6**, 1086-1095.
- Schrenk, M. O., Kelley, D. S., Delaney, J. R. & 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.
- Schut, G. J., Brehm, S. D., Datta, S. & Adams, M. W. W. (2003). Whole-genome DNA microarray analysis of a hyperthermophile and an archaeon: *Pyrococcus furiosus* grown on carbohydrates or peptides. *J Bacteriol* **185**, 3935-3947.
- Schut, G. J., Zhou, J. & Adams, M. W. W. (2001). DNA microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for a new type of sulfur-reducing enzyme complex. *J Bacteriol* **183**, 7027-7036.
- Segonzac, M. (1992). Les peuplements associés à l'hydrothermalisme océanique de Snake Pit (dorsale médio-atlantique; 23°N, 3480m) : composition et microdistribution de la mégafaune. *C R Acad Sci Paris* **314**, 593-600.
- Segonzac, M., De Saint Laurent, M. & Casanova, B. (1993). L'énigme du comportement trophique des crevettes *Alvinocarididae* des sites hydrothermaux de la dorsale Médio-atlantique. *Cah Biol Mar* **34**, 535-571.
- Sharp, R. J. & Raven, N. D. H. (1997). Isolation and growth of hyperthermophiles, In P. M. Rhodes and P. F. Stanbury (ed.), *Applied Microbial Physiology : A practical approach*. IRL Press, Oxford University press. p. 23-51
- Slobodkin, A. I., Tourova, T. P., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Jeanthon, C. & Jones, B. E. (2003). *Tepidibacter thalassicus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, fermentative bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1131-1134.
- Slobodkin, A., Campbell, B., Cary, S. C., Bonch-Osmolovskaya, E. A. & Jeanthon, C. (2001). Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 235-243.

- Sokolova, T. G., González, J. M., Kostrikina, A., Chernyh, N. A., Tourova, T. P., Kato, C., Bonch-Osmolovskaya, E. A. & Robb, F. T. (2001).** *Carboxydobranchium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO₂-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 141-149.
- Sokolova, T. G., Jeanthon, C., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Lebedinsky, A. V., Stackebrandt, E. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2004).** The first evidence of anaerobic CO₂ oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **8**, 317 - 323.
- Stach, J. E. M., Bathe, S., Clapp, J. P. & Burns, R. G. (2001).** PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol* **36**, 139-151.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J System Bacteriol* **44**, 846-849.
- Stackebrandt, E. (2003).** The richness of prokaryotic diversity: there must be a species somewhere. *Food Technol Biotechnol* **41**, 17-22.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P., Kampfer, P., Maiden, M., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. & Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Stahl, D., Lane, D. J., Olsen, G. & Pace, N. R. (1984).** Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts ribosomal RNA sequences. *Science* **224**, 409-411.
- Sterner, R. & Liebl, W. (2001).** Thermophilic Adaptation of Proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**, 39-106.
- Stetter, K. O. (1999).** Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* **452**, 22-25.
- Stetter, K. O., König, H. & Stackebrandt, E. (1983).** *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulfur-reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. *System Appl Microbiol* **4**, 535-551.
- Suzuki, Y., Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2004).** Microbial diversity in inactive chimney structures from deep-sea hydrothermal systems. *Microb Ecol* **47**, 186-196.
- K. (2004d).** Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active deep-sea hydrothermal field. *Extremophiles* **8**, 269 - 282.
- Takai, K., Hirayama, H., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2004a).** *Thiomicrospira thermophila* sp. nov., a novel microaerobic, thermotolerant, sulfur-oxidizing chemolithomixotroph isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the TOTO caldera, Mariana Arc, Western Pacific. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2325-2333.
- Takai, K., Hirayama, H., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2004b).** *Lebetimonas acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, acidophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the epsilon-Proteobacteria, isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the Mariana Arc. *Int J Syst Evol Microbiol* (sous presse).
- Takai, K., Inagaki, F., Nakagawa, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Sako, Y., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2003a).** Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated epsilon-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 167-174.
- Takai, K., Inoue, A. & Horikoshi, K. (2002).** *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1089-1095.
- Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2003b).** *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 839-846.
- Takai, K., Komatsu, T., Inagaki, F. & Horikoshi, K. (2001).** Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3618-3629.
- Takai, K., Nakagawa, S., Sako, Y. & Horikoshi, K. (2003c).** *Balnearium lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, strictly anaerobic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a black smoker chimney in the Suiyo Seamount hydrothermal system. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1947-1954.
- Takai, K., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2004b).** *Hydrogenimonas thermophila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the epsilon-Proteobacteria, isolated from a black smoker in a Central Indian Ridge hydrothermal field. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 25-32.
- Takai, K., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2004c).** *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1095-1100.

T

- Takai, K. & Horikoshi, K. (1999).** Genetic diversity of Archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**, 1285-1297.
- Takai, K. & Horikoshi, K. (2000).** *Thermosiphon japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* **4**, 9-17.
- Takai, K. H., Gamo, T., Tsunogai, U., Nakayama, N., Hirayama, H., Nealson, K. H. & Horikoshi,**

- Takai, K., Sugai, A., Itoh, T. & Horikoshi, K. (2000).** *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **50** Part 2, 489-500.
- Taylor, C. D., Wirsén, C. O. & Gaill, F. (1999).** Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2253-2255.
- Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Herndl, G. J. (2004).** Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by *Bacteria* and *Archaea* in the deep ocean. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4411-4414.
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G. & Ramsing, N. B. (1996).** Distribution of sulfate-reducing *Bacteria* in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number count and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1405-1415.
- Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Torsvik, V., Goksøyr, J. & Daae, F. L. (1990).** High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **56**, 782-787.
- ## U
- Urios, L., Cuff, V., Pignet, P. & Barbier, G. (2004a).** *Tepidibacter formicigenes* sp. nov., a novel spore-forming bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 439-443.
- Urios, L., Cuff-Gauchard, V., Pignet, P., Postec, A., Fardeau, M. L., Ollivier, B. & Barbier, G. (2004b).** *Thermosiphon atlanticus* sp. nov., a novel member of *Thermotogales* isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1953-1957.
- ## V
- Van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J. & Konings, W. N. (1998).** The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**, 163-170.
- Van Dover, C., Humphris, S., Fornari, D., Cavanaugh, C., Collier, R., Goffredi, S., Hashimoto, J., Lilley, M., Reysenbach, A., Shank, T., Von Damm, K., Banta, A., Gallant, R., Gotz, D., Green, D., Hall, J., Harmer, T., Hurtado, L., Johnson, P., McKiness, Z., Meredith, C., Olson, E., Pan, I., Turnipseed, M., Won, Y., Young, C. R. & Vrijenhoek, R. (2001).** Biogeography and ecological setting of Indian Ocean hydrothermal vents. *Science* **294**, 818-23.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D. Y., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H. & Smith, H. O. (2004).** Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74.
- Vetriani, C., Speck, M. D., Ellor, S. V., Lutz, R. A. & Starovoytov, V. (2004).** *Thermovibrio ammonificans* sp. nov., a thermophilic, chemolithotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 175-181.
- Voordeckers, J. W., Starovoytov, V. & Vetriani, C. (2005).** *Caminibacter mediatlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 773-779.
- ## W
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Trüper, H. G. (1987).** Report from the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J System Bacteriol* **37**, 463-464.
- Wery, N. (2000).** Caractérisation de micro-organismes thermophiles de la ride médio-Atlantique. Description de deux nouveaux genres bactériens. Doctorat d'Université. Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse, France.
- Wery, N., Gerike, U., Sharman, A., Chaudhuri, J. B., Hough, D. W. & Danson, M. J. (2003).** Use of a packed-column bioreactor for isolation of diverse protease-producing bacteria from antarctic soil. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1457-1464.
- Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M.-A., Godfroy, A. & Barbier, G. (2001a).** *Marinitoga camini*, gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 495-504.
- Wery, N., Moricet, J.-M., Cuff, V., J., J., Pignet, P., Lesongeur, F., Cambon-Bonavita, M.-A. & Barbier, G. (2001b).** *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1789-1796.
- Whitman, W. B. (2001).** Genus I. *Methanococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Garrity, G. M. (ed.). New York: Springer. pp 236-240.
- Wintzingerode, F., Gobel, U. B. & Stackebrandt, E. (1997).** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 213-229.
- Wirsén, C. O., Brinkhoff, T., Kuever, J., Muyzer, G., Molyneux, S. J. & Jannasch, H. W. (1998).** Comparison of a new *Thiomicrospira* species strain from the Mid-Atlantic Ridge with known hydrothermal vent isolates. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4057-4059.

- Wirsen, C. O., Sievert, S. M., Cavanaugh, C. M., Molyneux, S. J., Ahmad, A., Taylor, L. T., DeLong, E. F. & Taylor, C. D. (2002).** Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. *Appl Environ Microbiol* **68**, 316-325.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5088-5090.
- Woese, C. R., Achenbach, L., Rouviere, P. & Mandelco, L. (1991).** Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts. *System Appl Microbiol* **14**, 364-371.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4576-4579.

Y

- Yurkov, V. & Beatty, J. T. (1998).** Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the *Juan de Fuca* ridge in the Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* **64**, 337-341.

Z

- Zal, F. (1999).** *Riftia pachyptilia* : le ver géant des abysses. *La Recherche* **317**, 90-95.
- Zbinden, M. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2003).** Occurrence of *Deferribacterales* and *Entomoplasmatales* in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol Ecol* **46**, 23-30.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. & Keller, M. (2002).** Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15681-15686.
- Zuckerland, E. & Pauling, L. (1965).** Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* **8**, 357-366.

Annexes

Extraction des ARN totaux et RT-PCR

1. Extraction d'ARN totaux.

L'extraction est effectuée à l'aide de la solution RNA Now. Les échantillons de culture sont centrifugés pendant 3 min à 2500 g à température ambiante. Les culots bactériens sont ensuite repris, en vortexant vigoureusement pendant 1 min, dans 1 mL de solution RNA Now, respectivement. Après avoir ajouté 200 µl de chloroforme, l'échantillon est agité par retournements pendant 20 sec, puis laissé pendant 5 min dans la glace. Après centrifugation (15 min à 2500 g à 4 °C), la phase aqueuse est transférée dans un tube Eppendorf. Un volume d'isopropanol refroidi, égal à celui de la phase aqueuse, y est ajouté, puis l'échantillon est agité doucement par retournements et placé à -80 °C pendant 45 min. Après centrifugation 15 min à 9200 g à 4 °C et addition de 1,5 ml d'éthanol 70 %, l'échantillon est centrifugé 10 min à 4500g à 4 °C. Cette étape de lavage est renouvelée une seconde fois. Le culot d'ARN est ensuite repris dans 30 ou 50 µl d'eau traitée au DEPC (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et placé 10 min dans un bain-marie à 60 °C. Enfin la solution d'ARN est transférée dans un tube Eppendorf stérile contenant 20 U de RNase inhibitor (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et stockée à -80 °C.

2. Traitement DNase.

Afin d'éliminer d'éventuels ADN résiduels, 25 µl de l'extrait d'ARN sont traités pendant 1 h à 37 °C par 150 U de DNase I, RNase-free (Roche Diagnostics), en présence de 50 U de RNase inhibitor, dans un volume total de 100 µl. La DNase est ensuite inactivée par dénaturation à 90 °C pendant 5 min. L'échantillon est alors conservé à 4 °C jusqu'à la vérification par PCR de l'absence d'ADN dans l'échantillon traité. Dans ce cas, le mix PCR est de 40 µl et contient 36 µl des composants décrits par la suite et 4 µl de l'échantillon traité.

3. Conditions de PCR.

L'amplification est optimisée pour un mix PCR de 40 µl contenant les composants suivants: tampon PCR 1X (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3); Roche Diagnostics, Meylan, France), 200 µM de chaque dNTP (Roche Diagnostics), 1 U de *Taq* polymérase (Roche Diagnostics), 0,5 µM de chaque amorce et 200 ng d'extrait d'acides nucléiques ou d'eau (témoin négatif).

Les amplifications sont réalisées dans un appareil de type Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research, INC., Waltham, MA., USA) en utilisant les paramètres suivants: une dénaturation initiale de 5 min à 94 °C, 35 cycles de dénaturation, hybridation des amorces et polymérisation (durées et températures spécifiques des amorces utilisées), puis une étape d'élongation de 7 min à 72 °C.

4. Conditions de RT-PCR.

Pendant la réaction de RT, les échantillons d'ARN traités DNase I sont incubés 15 min à 42 °C en présence de MuIV Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), puis chauffés à 99 °C pendant 5 min. Ils sont conservés à 5 °C jusqu'à la PCR. Les concentrations finales pour la RT sont les suivantes: 3,5 mM MgCl₂ (25 mM), tampon PCR 1X, 1 mM de chaque dNTP, 20 U de RNase Inhibiteur, 50 U de MuIV RT, 1 µM de l'amorce antisens. Suite à la RT, une PCR est réalisée : le mix PCR est de 50 µl et contient 40 µl des composants décrits précédemment, avec 1,25 U de *Taq* polymérase et 10 µl d'échantillon amplifié en RT.

Protocole de clonage (kit TOPO TA Cloning, Invitrogen®).

1- préparation des produits de PCR, des milieux et des cellules

- amplification par PCR des fragments à cloner et vérification sur gel (les produits doivent être frais). Pour un produit ancien, relancer une élongation de 10 min à 72°C en présence de *Taq* et de dNTP.
- couler sur boîtes le milieu LB gélosé contenant 50 µg. mL⁻¹ d'ampicilline.
- laisser les boîtes sécher puis les placer à 37°C pendant 30 min.
- amener le milieu SOC (fourni avec le kit) à température ambiante.
- étaler 40 µl de X-Gal et 40 µl d'IPTG par boîte, laisser sécher.
- stocker à 37°C jusqu'à utilisation.

➤ Composition des milieux et solutions :

- milieu LB (Luria Bertani) : 10 g. L⁻¹ tryptone, 5 g. L⁻¹ d'extrait de levure, 10 g. L⁻¹ de NaCl.
- milieu LB gélosé : milieu LB + 15 g. L⁻¹ d'agar avant autoclavage.
- milieu SOC : 20 g. L⁻¹ tryptone, 5 g. L⁻¹ extrait de levure, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose
- IPTG : 100 mM
- X-Gal : 40 mg. mL⁻¹

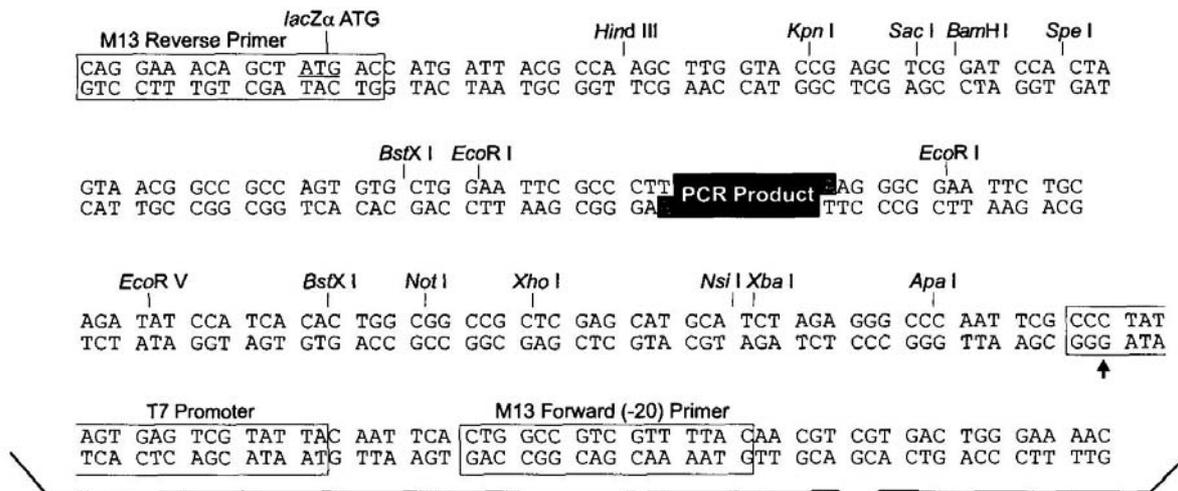
2-clonage

- décongeler sur glace les cellules *E. coli* TOP10F' (One Shot®) (1 tube par transformation).
- réaliser le mélange :

- produit frais de PCR	0,5 à 4 µl (selon la concentration)
- H ₂ O stérile	QSP 4 µl
- solution saline	1 µl
- TOPO-Vector	1µl (à prendre au dernier moment et à recongeler immédiatement)
<u>- Volume final</u>	6 µl
- Mélanger doucement
- Laisser 5 minutes à température ambiante (~25°C) pour ligaturer. Ce temps peut varier de 30 sec jusqu'à 30 min.
- Mettre dans la glace.
- Procéder immédiatement à la transformation.

3-transformation

- Ajouter 2 µl de la solution de clonage dans les cellules *E. coli* TOP10F' (One Shot®) décongelées.
- Mélanger doucement, sans pipetage successif.
- Laisser 5 à 30 min dans la glace, 10 min en moyenne.
- Réaliser le choc thermique en incubant les cellules 30 secs à 42°C sans agitation.
- Transférer immédiatement les tubes dans la glace : laisser 2 min.
- Ajouter dans chaque tube 250 µl de milieu SOC (qui doit être à température ambiante). Bien fermer les tubes.
- Agiter horizontalement à 200 rpm les tubes pendant 30 min (1 heure au maximum) à 37°C.
- Mettre dans la glace si temps d'attente.
- Étaler 50 à 100 µl de suspension cellulaire sur milieu gélosé préchauffé à 37°C. Tester 2 volumes différents.
- Laisser incuber une nuit (15-20 h) à 37°C.

4-Schéma du vecteur pCR[®] 2.1-TOPO[®]

Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547

M13 reverse priming site: bases 205-221

Multiple cloning site: bases 234-357

T7 promoter/priming site: bases 364-383

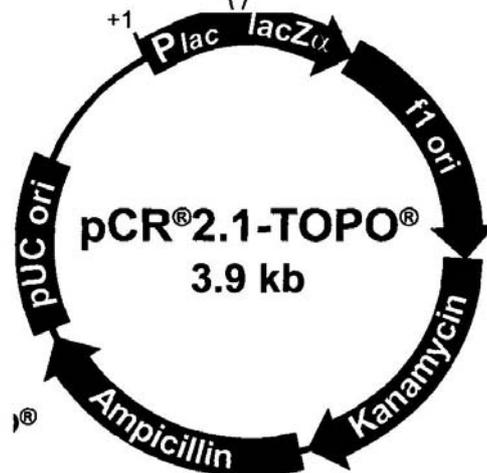
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406

f1 origin: bases 548-985

Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113

Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991

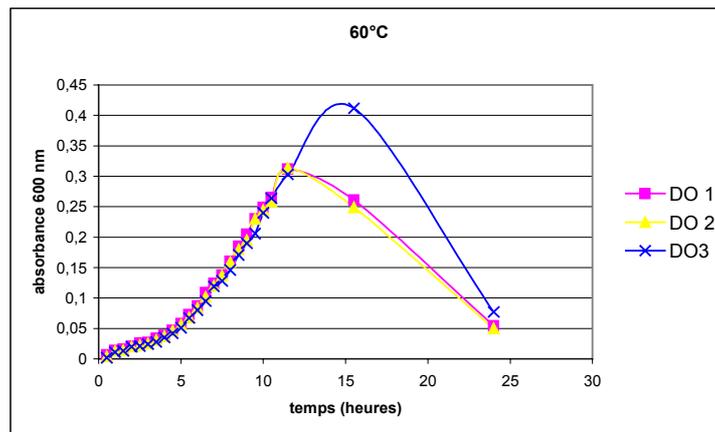
pUC origin: bases 3136-3809



Caractérisation d'une nouvelle espèce microbienne : exemple de calculs pour la détermination de la température optimale de croissance.

La gamme de température permettant une croissance est comprise entre 30 et 70°C. Des cultures ont été réalisées aux températures intermédiaires, et les cinétiques de croissance correspondantes ont été établies.

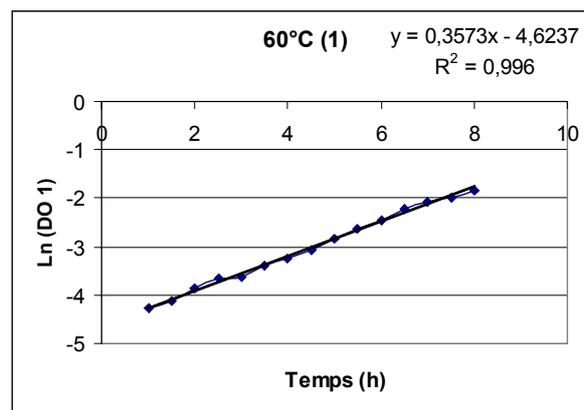
Prenons l'exemple de la température fixée à 60°C. Pour cette température, trois tubes ont étéensemencés et suivis par mesure de l'absorbance à 600 nm toutes les 30 min. Une première cinétique (**absorbance 600 nm**) = **f (temps)** est tracée pour chaque culture et correspond à la fonction suivante : $C(t) = C_0 \times e^{\mu t}$ avec C_0 : concentration initiale
 μ : taux de croissance.



La courbe **Ln(absorbance 600 nm) = f (temps)** est ensuite tracée, ce qui correspond à l'équation : $\text{Ln}(C(t)) = \text{Ln}(C_0) + \mu t$.

Le taux de croissance μ_{max} correspond à la pente maximale de la courbe obtenue, dans sa partie linéaire, i.e. pendant la phase exponentielle. En ne considérant que les points alignés (les phases de latence et stationnaire sont donc exclues), une courbe de tendance est insérée (logiciel Excel) : elle donne la pente et le coefficient de détermination R^2 .

Voici l'exemple d'une des trois cultures :



L'utilisation de la fonction "droite de régression" (Excel) permet le calcul de l'écart type associé à la pente est calculé.

	0,357342137	-4,62372562	} Affichage de la fonction droite de régression dans Excel.
	0,006318174	0,031538176	
	0,995952408	0,052861639	
R ²	3198,786512	13	
	8,93853819	0,036326587	

Pente

Ecart type

Pour chaque température, la moyenne μ des trois taux de croissance est obtenue par la formule :

$$\mu_{\text{moy}} = \frac{\sum \mu_i}{p} \quad \text{avec } p : \text{ nombre de répétitions.}$$

L'écart type ($\sigma_{\mu \text{ moy}}$) associé à la pente moyenne est ensuite calculé grâce à la formule :

$$\sigma_{\mu \text{ moy}} = \sqrt{\frac{\sum (\sigma_i)^2}{p^2}}$$

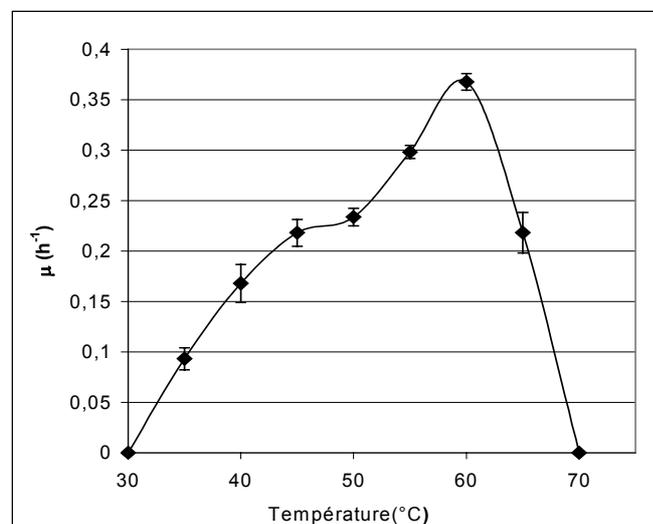
Par exemple, pour la température de 60°C, les résultats suivants sont obtenus :

$\mu_1 = 0,357342137$	$\sigma_1 = 0,006318174$
$\mu_2 = 0,370921728$	$\sigma_2 = 0,005819426$
$\mu_3 = 0,375072936$	$\sigma_3 = 0,008654934$
$\mu_{\text{moy}} = 0,367778934$	$\sigma_{\mu \text{ moy}} = 0,004064657$

Ainsi, pour chaque température, μ_{moy} est associé à un intervalle de confiance correspondant à $\pm 2 \sigma_{\mu \text{ moy}}$.

Dans l'exemple ci-dessus : $\mu_{\text{moy}} = 0,367778934 \pm 0,008129314$.

Une courbe $\mu_{\text{max}} \text{ moyen} = f(\text{température})$ est ensuite tracée, en représentant les intervalles de confiance. A titre d'exemple, voici la courbe obtenue pour la souche AT1271^T : la température optimale peut être déterminée visuellement : elle est de 60°C.



Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media

Anne Postec, Patricia Pignet, Valérie Cueff-Gauchard, Anne Schmitt,
Joël Querellou and Anne Godfroy*

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 Ifremer, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

*: Corresponding author : agodfroy@ifremer.fr

Abstract:

The hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* was cultivated in continuous culture in a gas-lift bioreactor in the absence of elemental sulphur on both proteinaceous and maltose-containing media. Optimal conditions (pH, temperature and gas flow rate), determined on complex media that yielded maximal growth rate and maximal steady state cell density, were obtained at 80°C, pH 6 and gas sparging at 0.2 v v⁻¹ min⁻¹. Higher steady state cell densities were obtained on a medium containing maltose and yeast extract. In order to design a defined and minimal media, the nutritional requirements of *T. hydrothermalis* were then investigated using continuous culture in the absence of elemental sulphur in the gas-lift bioreactor. First, the complex nutrients were replaced and a defined medium containing maltose, 19 amino acids and the two nitrogenous bases adenine and thymine, was determined. Secondly, selective feedings and withdrawal of amino acids showed requirements for 14 amino acids.

Abstract

The hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* was cultivated in continuous culture in a gas-lift bioreactor in the absence of elemental sulphur on both proteinaceous and maltose containing media. Optimal conditions (pH, temperature and gas flow rate), determined on complex media that yielded maximal growth rate and maximal steady state cell density were obtained at 80°C, pH 6 and gas sparging at 0.2 v.v⁻¹.min⁻¹. Higher steady state cell densities were obtained on a media containing maltose and yeast extract. In order to design a defined and minimal media, the nutritional requirements of *T. hydrothermalis* were then investigated using continuous culture in the absence of elemental sulphur in the gas-lift bioreactor. First, the complex nutrients were replaced and a defined medium containing maltose, 19 amino acids and the two nitrogenous bases adenine and thymine, was determined. Secondly, selective feedings and withdrawal of amino acids showed requirements for 14 amino acids.

Keywords : *Thermococcus hydrothermalis*, gas-lift bioreactor, culture optimisation, defined and minimal media

1.Introduction

Within the hyperthermophilic archaea, species belonging to the order *Thermococcales*, have been extensively studied in both fields of physiology and genomics. In addition to their phylogenetic and ecological interest, hyperthermophilic archaea were identified early on, as potentially interesting organisms for the production of thermostable enzymes. *Thermococcales* species can grow in the absence of elemental sulphur but for most of these species, the addition of sulphur greatly enhances growth in closed culture. Raven et al. (1992) showed that a glass

gas-lift bioreactor could be used to grow *Pyrococcus furiosus* at high cell densities in the absence of elemental sulphur. This experimental system was then used to develop a defined and minimal media that supported the growth of *P. furiosus* [12]. Using the same system, *Pyrococcus abyssi* ST549 was cultivated at high cell density on complex media containing yeast extract and peptone in the absence of elemental sulphur [7].

T. hydrothermalis was first isolated from a deep-sea hydrothermal vent of the East Pacific Rise. It has been shown to grow at temperatures ranging from 55 to 100°C; it is strictly anaerobic chemoorganotrophic. Descriptive study of this strain [6] revealed that *T. hydrothermalis* was able to grow on both proteinaceous substrates (or a mixture of amino acids) and on maltose, and a recent study confirmed that it could use maltose (in the presence of a small amount of yeast extract) and amino acids as carbon and energy sources in the presence of elemental sulphur.

Several enzymatic activities have been identified and characterised in *T. hydrothermalis* : α -amylase [9], pullulanase [5], α -glucosidase [8] and alcohol dehydrogenase [2]. In this paper, we determined the optimal conditions for the cultivation *T. hydrothermalis* in a gas-lift bioreactor in the absence of elemental sulphur and investigated its nutritional requirements in order to develop a defined and minimal medium.

2. Materials and methods

2.1 Strain

T. hydrothermalis type strain AL662 (CNCM-I1319) was isolated in our laboratory [6].

2.2 Media

The growth medium was SME Y(1) P(2) medium [19] modified according to Sharp and Raven [11,18]. In further experiments, peptone was replaced by maltose at 2.5 or 5 g.l⁻¹ [SME Y(1) mal(5) or SME Y(1) mal(2.5) media]. When yeast extract was replaced by the 20 amino acids, the latter were first used each at a concentration of 0.1 g.l⁻¹ [SME 20AA(0.1) mal(2.5)], then, they were used at the same concentrations as in a 1 g.l⁻¹ aqueous suspension of yeast extract [SME 19AA[Y] mal(2.5)]. Quantitative estimations of the concentration of each free amino acid in an aqueous suspension of yeast extract at 1 g.l⁻¹ were determined by HPLC. The concentrations (per litre) were : Ala 42 mg, Arg 22 mg, Asn 14 mg, Asp 6.5 mg, Gln none, Glu 47 mg, Gly 16 mg, His 4 mg, Ile 25 mg, Leu 42 mg, Lys 23 mg, Met 4 mg, Phe 24 mg, Pro 14 mg, Ser 18 mg, Thr 12 mg, Trp 4 mg, Tyr 10 mg and Val 30 mg. Cys used as reductant, was maintained at 0.5 g l⁻¹. The media were sterilised by filtration (Sartroban 0.22 µm filters, Sartorius) into 20 l Nalgene bottles previously sterilised by autoclaving.

2.3 Growth conditions

Closed cultures were performed in 100 ml serum vial containing 50 ml of medium and sulphur as previously described [6]. Continuous culture experiments were performed using a gas-lift bioreactor, sparged with nitrogen as previously described by Raven [7,11,12,18]. The 2-litre volume glass vessel and Teflon top plate were fabricated by Radleys (UK). Temperature was controlled by a heated circulating bath filled with water, and temperature was monitored with a standard PT100 probe covered with Teflon. The pH was monitored using a combination gel pH electrode (Mettler Toledo) and acid and base were added with two peristaltic pumps (Masterflex). pH and temperature were controlled by a 4-20 mA controller and AFS

Biocomand system from New Brunswick (Nimjgen, Netherlands). Fresh medium feeding and culture draw-off were performed using peristaltic pumps (Masterflex). Unless otherwise indicated, continuous cultures were carried out at 80°C and pH 6, according to the descriptive study of the strain. Unless otherwise indicated, the dilution rate was 0.2 h⁻¹ according to the previously determined growth rate [6] and under nitrogen sparging at 0.2 v.v⁻¹.min⁻¹.

2.4 Determination of cell density

Cell numbers were determined by direct cell counting using a Thoma cell (0.02mm depth) under a phase contrast Olympus model BH-2 microscope. When necessary, samples were diluted in sterile water containing NaCl at 23 g.l⁻¹. A steady-state was considered to be obtained when the cell densities remained effectively constant for a period in excess of three culture volume changes, corresponding to 15h at a dilution rate of 0.2 h⁻¹ [11].

2.5 Growth rate determination

To determine the specific growth rate of *T. hydrothermalis* on the different media, batch culture experiments were carried out in the gas-lift bioreactor. A steady state continuous culture under the above culture conditions was washed out in order to lower significantly cell density. Medium feeding and drawing off were then stopped, and growth under batch conditions was followed by regular cell counting (every 15 min, 3 counts per sample). Growth rate were determined by performing a linear regression along the logarithmic part of the growth curve. Where enough data were available, growth rate confidence limits are given (+/- 2 x standard errors). Wash out experiments were performed first to determine growth rates according to the formula $[1/x(dx/dt) = \mu_{max} - D]$ [4], but problems with the reliability of media delivery rate

measurement at high dilution rates ($D \geq 2$) were shown to significantly affect growth rate calculations.

2.6 Amino acids and maltose analysis by HPLC

The amino acids and maltose in the culture medium were analysed by means of HPLC (Alliance 2690; Waters), as described by Wery *et al.* [22].

3. Results

*3.1 Determination of the optimal conditions for the growth of *T. hydrothermalis* in continuous culture on SME Y(1)P(2) medium*

Optimal conditions of pH (pH 6) and temperature (80-85°C) conditions for the growth of *T. hydrothermalis* were previously determined, in flask, on a complex medium in the presence of elemental sulphur [6]. These conditions (pH 6 and 80°C) were the first conditions used for the cultivation of *T. hydrothermalis* in the gas-lift bioreactor. Good growth was observed with a steady state cell densities ranging from 8×10^8 to 1×10^9 cell.ml⁻¹ at dilution rate of 0.2h⁻¹. The effect of gas sparging was studied by varying the nitrogen flow from 0.1 to 0.3 v.v⁻¹.min⁻¹. Maximal steady state cell density was obtained at 0.2 v.v⁻¹.min⁻¹. The effect of higher gas flow rates could not be tested due to the build up of surface foam. We then examined the effect of temperature and pH on maximal steady state cell densities. Figure 1 shows that steady state cell density dramatically decreases when pH is lowered to 4 and to a lesser degree at pH 5. At pH 8, foam formation prevented further experiment and no significant difference in maximal steady state cell densities was observed at pH 6 and 7. Temperature effects were tested from 70° to 95°C at pH 6. Significant effect (compared to 80°C) was observed at 70°, 90° and cell concentration dramatically decreased at 95 °C without reaching a new equilibrium state (not shown). No significant difference was observed between 80 and 85°C. To determine the effects

of both temperature and pH on the growth of *T. hydrothermalis* under these conditions, maximal growth rates were determined for some combination of pH and temperature on the complex medium SME Y(1) P(2) (figure2). The higher maximal growth rate (2.7h^{-1}) and the highest steady state cell density were obtained at pH 6 and at 80°C . At pH 6, growth started immediately, without a latent phase. At pH 7, growth rate was slightly lower than at pH 6, and a latent phase of 20 min was noticeable. At pH 5, growth rates were considerably lower. At both pH 6 and 7, the growth started earlier and high maximal growth rate was observed at 80°C . Maximal growth rate at optimal pH and temperature was determined during the early part of the logarithmic of growth ($\mu_{\text{max}}=2.7\text{h}^{-1}$) and, in fact a decrease of the growth rate ($\mu_{\text{max}}=1.2\text{h}^{-1}$) was often observed after 45 min of culture. To confirm the existence of these two growth phases, other experiments were carried out by washing out the culture in order to obtain lower initial cell densities (around $1 \times 10^6\text{ cells.ml}^{-1}$ compared to $3 \times 10^7\text{ cells.ml}^{-1}$ in previous experiments). Three growth curves were obtained. All showed an initial rapid growth phase with a maximal growth rate of $3.03 (+/-0.06)\text{ h}^{-1}$ corresponding to a generation time of 14 min, then growth rate decreased to $1.23 (+/-0.02)\text{ h}^{-1}$, corresponding to a generation time of 35 min. The high growth rate was confirmed with a short continuous culture experiment where dilution rate was increased up to 2 h^{-1} : under these conditions, a steady state cell density of $6.3 \times 10^7\text{ cell. ml}^{-1}$ was achieved

2.2 Growth of *T. hydrothermalis* in continuous culture on maltose

Previous studies have shown that *T. hydrothermalis* could grow on a medium containing maltose and yeast extract [6] . When *T. hydrothermalis* was grown on SME Y(1) mal(5) medium, in the gas-lift bioreactor a higher maximal steady state cell

density (1.7×10^9) was observed, compared to SME Y(1)P(2) medium, at a dilution rate of 0.2 h^{-1} and gas sparging of $0.2 \text{ v.v}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Yeast extract concentration in the culture medium was then lowered from 1 g.l^{-1} to 0.5 g.l^{-1} and 0.25 g.l^{-1} and again high steady state cell densities were obtained, respectively 1.1×10^9 and $4.75 \times 10^8 \text{ .cell.ml}^{-1}$. Gas sparging up to $0.5 \text{ v.v}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ had no effect on the maximal steady state cell density in the SME Y(0.5) mal(5) medium and no foam formation was observed at high gas flow rates. HPLC analysis demonstrated that maltose 5 g.l^{-1} was in large excess. Reducing maltose concentration to 2.5 g.l^{-1} had no effect on steady state cell density. Maximal growth rate on SME Y(1) mal(2.5) medium was $1.72 (+/-0.05) \text{ h}^{-1}$, corresponding to a generation time of 24 min. On this medium, no slowing of the growth was observed.

2.3 Defined medium determination

In order to determine defined and minimal media, yeast extract 1 g.l^{-1} was first replaced by the 20 amino acids, each at a concentration of 0.1 g.l^{-1} "SME mal(2.5) 20AA(0.1)" medium, except for cysteine, used as reductant, at a concentration of 0.5 g.l^{-1} . This resulted in a dramatic decrease in cell density to $5.0 \times 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$ after 24 hours of culture, without reaching a stationary state. Then, 19 amino acids were added, each at the same concentration as in an aqueous solution of yeast extract at 1 g.l^{-1} . On this medium "SME 19AA [Y] mal (2.5)", a stationary state was obtained with a maximal cell density at $2.7 \times 10^7 \text{ cell.ml}^{-1}$. However the resulting cell density was rather low compared with the density obtained on the medium SME Y(1) mal(2.5), suggesting that at least one important element, present in yeast extract was lacking in the defined medium. The effect of nitrogenous bases, thymine, adenine, uracile and cystosine was then tested each at the concentration of 10 mg.l^{-1} . The

dilution rate was lowered from 0.2 to 0.1 h⁻¹ in this experiment, in order to begin with a higher initial cell density and to reduce the wash-out risk in the absence of growth. The addition of the 2 nitrogenous bases adenine and thymine resulted in a 10X greater steady state cell density, compared to that obtained in their absence. When the dilution rate was increased to 0.2 h⁻¹, a steady state cell density of 6.2 x10⁸ cell.ml⁻¹ was achieved. A growth rate of 1.1 h⁻¹, corresponding to a generating time of 38 min, was achieved during the continuous culture of *T. hydrothermalis* on the defined medium SME 19AA [Y] mal (2.5) +A+T.

2.4 Minimal media determination

A requirement for essential amino acids was determined previously (not shown), by cultivation of *T. hydrothermalis* on SME 20AA medium lacking individual amino acids in closed batch culture in the presence of elemental sulphur. Under these conditions, amino acids are used as both carbon and nitrogen sources. No growth was observed in the absence of Val, Thr, Met, Phe, Ile, Leu, Arg, Trp, Tyr, and Lys. Amino acid requirements were tested in the absence of sulphur in a continuous culture on the defined medium. First, all amino acids have been removed from the defined medium (except L-cystein which is used as reductant), NH₄Cl 1 g.l⁻¹ was added as nitrogen source and L-ascorbic acid 1 g.l⁻¹ was added to avoid chemical precipitation according to Raven and Sharp [12]. No growth was observed in the absence of amino acids in the medium, indicating that at least one of the amino acids was essential for growth of the strain. Then, amino acids were added and withdrawn from the defined medium by biosynthetic pathway group. An equilibrium state was obtained with a cell concentration of 2.2x10⁸ cell.ml⁻¹ when Gly and Ser were omitted together. A very low cell density (4.6x10⁶ cell.ml⁻¹) was achieved when Ala, Leu and

Val were deleted. These results suggested that Ser and Gly have no effect whereas at least one of the amino acids Ala, Leu or Val was important for growth. No stationary state was reached when the Glu, Gln, Pro, and Arg group; the Phe, Tyr, Trp and His group, and the Asp, Asn, Met, Thr, and Ile group were withdrawn, suggesting that each of these groups contained at least one essential amino acid for the growth of *T. hydrothermalis* in the gas-lift bioreactor.

The 9 amino acids (Ala, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, His, Pro, Ser), previously shown to be not essential for the growth of *T. hydrothermalis* in closed culture in the presence of sulphur, when omitted individually, were deleted as a group from the defined medium. Cell density decreased dramatically, without reaching a stationary state. Among these amino acids, HPLC analysis showed that Ala, Asn and His were entirely consumed during culture in the defined medium. The addition of Ala, Asn and His allowed a stabilisation of cell density at about 2.0×10^7 cell.ml⁻¹. In the end, only 6 amino acids could be omitted: Asp, Glu, Gly, Pro, Ser and Gln (not present in yeast extract). Vitamin requirements were tested by elimination of all vitamins from the "SME 14 AA, mal (2.5) +A +T" media and from the defined medium. In both cases there was no effect on the growth of *T. hydrothermalis*. Similarly the removal of maltose was tested by cultivating the strain on the medium "SME 14 AA, +A +T +vitamins". A cell density decrease was observed and no stationary state could be reached. While *T. hydrothermalis* growth on the minimal medium (composition given in Table 1) was comparable to the growth on complex media there was considerable variation in steady state cell densities between experiments. Also we observed better growth on the minimal medium after several days of growth on the defined medium than following direct transition from the complex media to the minimal media.

4. Discussion

The present study provides conditions for the growth of *T. hydrothermalis* at high cell densities under controlled conditions. The cultivation of this strain in the absence of elemental sulphur using a gas-lift bioreactor was shown to be efficient on both complex and defined media. This confirms the organism's ability to use both complex substrates or maltose as carbon and energy sources in the absence of elemental sulphur. On the complex medium, containing both yeast extract and peptone, *T. hydrothermalis* exhibited very rapid growth, and high steady state cell density could be maintained for a long period. On this medium growth began very quickly then slowed. This was not observed on other media that contained yeast extract alone or yeast extract and maltose, and could be due to a preferential first use of a more efficient substrate present in peptone. Maltose allowed growth at high cell densities, even when yeast extract concentration in the medium was lowered to 0.25 g.l^{-1} . However total elimination of yeast extract led to a dramatic decrease in cell concentration demonstrating that growth on maltose alone is not possible. We were able to replace the complex yeast extract with a mixture of 19 amino acids and adenine and thymine and then with a mixture of 14 amino acids and adenine and thymine. This led to the determination of defined and minimal media. The replacement of yeast extract by the 20 amino acids each at 0.1 g.l^{-1} led to a washing out of the culture, while their addition at the same concentration as free amino acids in 1 g.l^{-1} yeast extract allowed growth. This might be explained by competition between amino acids for amino acid uptake. Growth on the 20 amino acids as sole carbon and energy sources occurred in closed vessels culture in the presence of elemental sulphur, while dramatic a decrease was observed on both the defined and minimal media without maltose in the absence of elemental sulphur, suggesting that

amino acid utilisation as sole carbon and energy sources did not occur in the absence of elemental sulphur, as it was demonstrated for *P. furiosus* [1]

Our results confirm the importance of effective cultivation methods for addressing physiological issues related to the growth of heterotrophic hyperthermophiles. Growth of heterotrophic hyperthermophiles in continuous culture was previously reported for *P. furiosus* [12] and for *Thermococcus litoralis* and the bacterial species *Thermotoga maritima* [14-16], for both the optimisation of growth conditions and the determination of defined or minimal media. The availability of defined media can allow the direct observation of the utilisation of individual nutrients the organism's ability to respond to the addition of a selected substrate and increase the production of thermostable enzymes of basic research or industrial interest. The existence of a wall effect was reported for both *T. litoralis* and *T. maritima* by Rinker and Kelly [15]. In this study increasing the dilution rate up to 2 h^{-1} (in wash out experiments for determination of maximal growth rate) did not result in the wash out the culture suggesting the existence of such a wall effect. However the determination of maximal growth rate in batch growth experiments showed that this apparent wall effect (i.e. stabilisation of cell concentrations during wash out experiments) corresponded in fact to the establishment of a new steady state at a higher dilution rate where growth rate was superior to the applied dilution rate.

The high growth rates observed here may be of ecological importance since they suggest that species belonging to the *Thermococcales* can grow very quickly when conditions are favourable. This could permit rapid colonisation of new favourable habitats. In situ colonisation experiments using "vent cap" chambers have shown that *Thermococcales* were the dominant archaeal species [3,10,13] and diversity analysis of hydrothermal samples such as chimney fragments showed

Thermococcales, in most samples [20,21], even in the inner parts of a chimney walls [17]. These data suggest that *Thermococcales* and probably other heterotrophic hyperthermophiles may play an important role in the degradation of the organic matter in the hydrothermal vent ecosystem.

5. Acknowledgements

We want to thank Dr Neil Raven and Pr Richard Sharp for welcoming one of us (AG) in their laboratory and for allowing us to transfer the gas-lift bioreactor technology to our laboratory. We also thank Pr S. Kim Juniper for helpful reading of the manuscript.

Table1:

Compounds	Concentration (per liter)
NaCl	28 g
L-cystein	0.5 g
Resazurin	0.5 mg
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	1.8 mg
Mg Cl ₂ , 6 H ₂ O	1.4 mg
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	9 mg
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	2.5 mg
NiCl ₂ , 6 H ₂ O	2.5 mg
AlK(SO ₄) ₂ , 12 H ₂ O	0.3 mg
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0.3 mg
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0.15 mg
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	56 mg
NaBr	25 mg
KCl	16 mg
KI	10 mg
SrCl ₂ , 6 H ₂ O	4 mg
K ₂ HPO ₄	500 mg
H ₃ BO ₃	7.5 mg
Na ₂ WO ₄ , 2 H ₂ O	3.3 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0.15 mg
Na ₂ SeO ₃	0.005 mg
FeCl ₂ , 4 H ₂ O	10 mg
Amino acids	
Asn	14 mg
His	4 mg
Arg	22 mg
Thr	12 mg
Ala	42 mg
Tyr	10 mg
Val	30 mg
Met	4 mg
Ile	25 mg
Leu	42 mg
Phe	24 mg
Trp	4 mg
Lys	23 mg
Maltose	2.5 g
Nitrogenous bases	
Adenine	10 mg
Thymine	10 mg

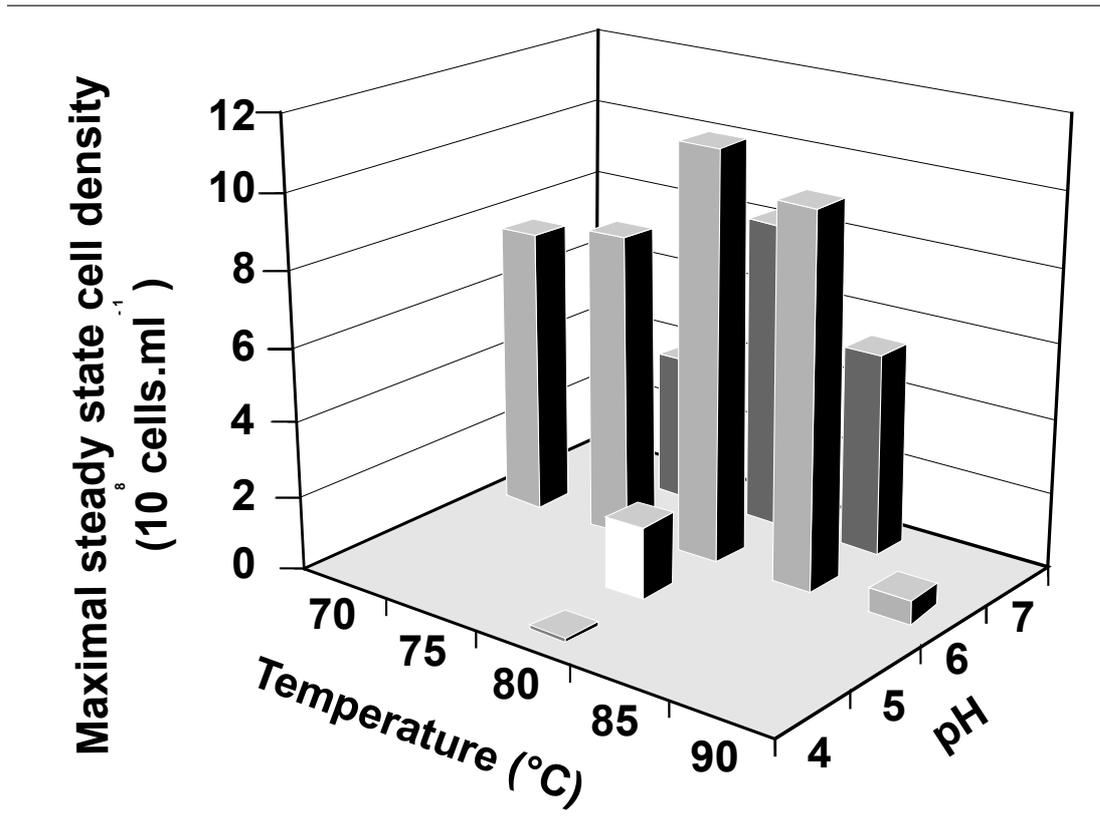


Figure 1

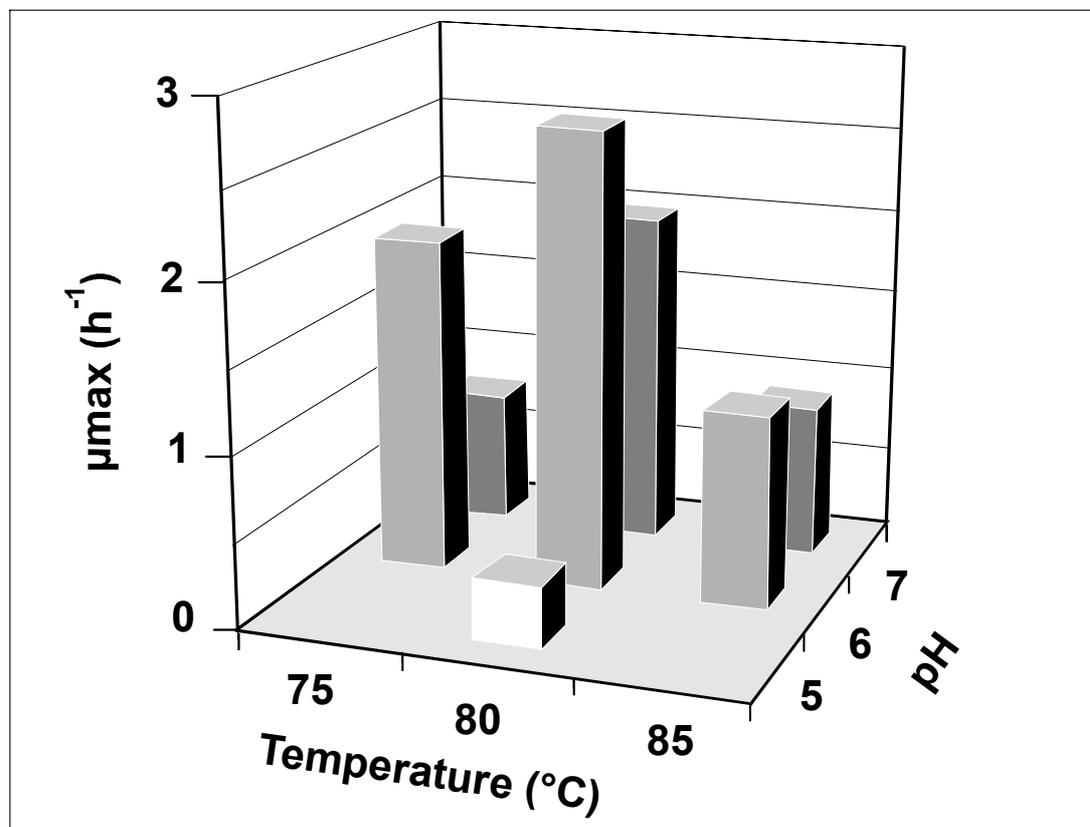


Figure 2

Legends of figures

Table 1 : Composition of the minimal medium.

Figure 1 : Effect of pH and temperature on the maximal steady state cell density of *T. hydrothermalis* grown on SME Y(1) P(2) medium in continuous culture ($D= 0;2 \text{ h}^{-1}$) in the gas-lift bioreactor.

Figure 2: Effect of pH and temperature on maximal growth rate of *T. hydrothermalis* grown on SME Y(1) P(2) medium cultivated in the gas-lift bioreactor.

6. References

- [1] M.W.W. Adams, J.F. Holden, A.L. Menon, G.J. Schut, A.M. Grunden, C. Hou, A.M. Hutchins, F.E. Jenney, C. Kim, K.S. Ma, G.L. Pan, R. Roy, R. Sapra, S.V. Story, M. Verhagen, Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 716-724.
- [2] E. Antoine, J.L. Rolland, J.P. Raffin, J. Dietrich, Cloning and over-expression in *Escherichia coli* of the gene encoding NADPH group III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus hydrothermalis*, *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 880-889.
- [3] E. Corre, A.-L. Reysenbach, D. Prieur, ϵ -Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge, *FEMS Microbiol. Lett.* 205 (2001) 329-335.
- [4] L.C. Duarte, A.P. Nobre, F.M. Girio, M.T. Amaral-Collaço, Determination of the kinetic parameters in continuous cultivation by *Debaromyces hansenii* grown on xylose, *Biotechnol. Techn.* 8 (1994) 859-864.
- [5] M. Erra-Pujada, P. Debeire, F. Duchiron, M.J. O'Donohue, The Type II Pullulanase of *Thermococcus hydrothermalis*: Molecular Characterization of the Gene and Expression of the Catalytic Domain, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3284-3287.
- [6] A. Godfroy, F. Lesongeur, G. Raguénès, J. Quérellou, E. Antoine, J.-R. Meunier, J. Guezennec, G. Barbier, *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 622-626.
- [7] A. Godfroy, N.D.H. Raven, R.J. Sharp, Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549, *FEMS Microbiol. Lett.* 186 (2000) 127-132.

- [8] E. Legin, C. Ladrat, A. Godfroy, G. Barbier, F. Duchiron, Thermostable amyolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. Some properties of a thermostable alpha-glucosidase, C. R. Acad. Sci. III. 320 (1998) 893-898.
- [9] E. Leveque, B. Haye, A. Belarbi, Cloning and expression of an alpha-amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme, FEMS Microbiol. Lett. 186 (2000) 67-71.
- [10] O. Necessian, A.-L. Reysenbach, D. Prieur, C. Jeanthon, Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N), Environ. Microbiol. 5 (2003) 492-502.
- [11] N. Raven, N. Ladwa, R. Sharp, Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 (1992) 263-267.
- [12] N.D.H. Raven, R.J. Sharp, Development of defined and minimal media for the growth of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* Vc1, FEMS Microbiol. Lett. 146 (1997) 135-141.
- [13] A.L. Reysenbach, K. Longnecker, J. Kirshtein, Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000) 3798-3806.
- [14] K.D. Rinker, C.J. Han, R.M. Kelly, Continuous culture as a tool for investigating the growth physiology of heterotrophic hyperthermophiles and extreme thermoacidophiles, J. Appl. Microbiol. 85 Suppl. S (1999) 118S-127S.
- [15] K.D. Rinker, R.M. Kelly, Effect of carbon and nitrogen sources on growth dynamics and exopolysaccharide production for the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis* and Bacterium *Thermotoga maritima*, Biotechnol. Bioeng. 69 (2000) 537-547.
- [16] K.D. Rinker, R.M. Kelly, Growth physiology of the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation, Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 4478-4485.
- [17] M.O. Schrenk, D.S. Kelley, J.R. Delaney, J.A. Baross, Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 3580-3592.
- [18] R.J. Sharp, N.D.H. Raven in: P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, (Eds.) Applied Microbial Physiology : A practical approach IRL Press, Oxford University press. 1997, pp. 23-51.
- [19] K.O. Stetter, H. König, E. Stackebrandt, *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulfur-reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C., System. Appl. Microbiol. 4 (1983) 535-551.
- [20] K. Takai, K. Horikoshi, Molecular phylogenetic analysis of archaeal intron-containing genes coding for rRNA obtained from a deep-subsurface geothermal water pool, Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 5586-5589.
- [21] K. Takai, T. Komatsu, F. Inagaki, K. Orikoishi, Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure, Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 3618-3629.
- [22] N. Wery, F. Lesongeur, P. Pignet, V. Derennes, M.-A. Cambon-Bonavita, A. Godfroy, G. Barbier, *Marinitoga camini*, gen. nov. , sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent, Int. J. System. Evol. Microbiol. 51 (2001) 495-504.

Thermosipho atlanticus sp. nov., a novel member of the *Thermotogales* isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent

Laurent Urios,¹ Valérie Cueff-Gauchard,¹ Patricia Pignet,¹ Anne Postec,¹ Marie-Laure Fardeau,² Bernard Ollivier² and Georges Barbier¹

Correspondence

Georges Barbier

Georges.Barbier@ifremer.fr

or

Georges.Barbier@univ-brest.fr

¹Laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Extrêmophiles, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France

²Laboratoire IRD de Microbiologie des Anaérobies, UR 101, Universités de Provence et de la Méditerranée, CESB-ESIL, case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille, France

A novel anaerobic, thermophilic and heterotrophic bacterium, designated strain DV1140^T, was isolated from a deep-sea hydrothermal vent sample from the Mid-Atlantic Ridge. The cells were non-motile straight rods, 1.8 µm long and 0.4 µm wide, surrounded by an outer sheath-like structure (toga). They grew at 45–80 °C (optimum 65 °C), pH 5.0–9.0 (optimum pH 6.0) and at sea salt concentrations of 20–60 g l⁻¹ (optimum 30 g l⁻¹). Strain DV1140^T was able to ferment yeast extract, peptone, brain heart infusion, gelatin, starch, galactose, arabinose, glucose, trehalose and cellobiose. The fermentation products identified on glucose in the presence of yeast extract and peptone were acetate, isovalerate and hydrogen. The G + C content of the genomic DNA was 33 mol%. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence (GenBank accession number AJ577471) located the strain within the genus *Thermosipho* in the bacterial domain. On the basis of 16S rRNA gene sequence comparisons, and physiological and biochemical characteristics, the isolate represents a novel species, for which the name *Thermosipho atlanticus* sp. nov. is proposed. The type strain is DV1140^T (= CIP 108053^T = DSM 15807^T).

Members of the order *Thermotogales* have been isolated from various extreme environments such as hot springs, oil reservoirs and marine hydrothermal vents. They are anaerobic, thermophilic and heterotrophic bacteria characterized by the presence of a toga, an outer sheath-like structure surrounding the cells. The order *Thermotogales* includes six genera: *Fervidobacterium*, *Thermotoga*, *Geotoga*, *Petrotoga*, *Marinitoga* and *Thermosipho*. At the time of writing, only four species belonging to the genus *Thermosipho* have been described: *Thermosipho africanus* (Huber *et al.*, 1989), *Thermosipho japonicus* (Takai & Horikoshi, 2000), *Thermosipho melanesiensis* (Antoine *et al.*, 1997) and *Thermosipho geolei* (L'Haridon *et al.*, 2001). *Thermosipho africanus* Ob7^T was isolated from a coastal hydrothermal spring. *Thermosipho japonicus* IHB1^T and *Thermosipho melanesiensis* BI429^T were isolated from deep marine hydrothermal vents. *Thermosipho geolei* SL31^T was isolated from a deep continental oil reservoir. In this study we report the description of a novel thermophilic

bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney, and assign this to a novel species within the genus *Thermosipho*.

Different types of samples were collected by the human-operated submersible *Nautilie* in 1994 during the DIVA2 cruise on deep-sea vent fields of the Mid-Atlantic Ridge: Lucky Strike (32° 16' W 37° 17' N; 1600–1700 m water depth) and Menez-Gwen (31° 31' W 37° 51' N; 800–1000 m water depth). Fragments of an active black smoker chimney were collected by the DSV *Nautilie* at Menez-Gwen and placed in an insulated box previously filled with sterile sea water. The box was opened in an on-board laboratory under sterile conditions. Friable pieces of chimney wall were crushed in an anaerobic chamber after addition of sterile sea water. Subsamples were transferred in cryotubes with 5% DMSO and in serum vials stored, respectively, at –70 °C and 4 °C.

For inoculations, contents from one serum vial (10 ml) and one cryotube (1.8 ml) were mixed and diluted to 60 ml with 23 g l⁻¹ NaCl. Enrichments (1 ml inoculum in 20 ml culture medium) and isolations were performed using PEXS medium (Urios *et al.*, 2004) at different temperatures (50, 65 and 80 °C). Positive cultures were determined by

Published online ahead of print on 7 May 2004 as DOI 10.1099/ij.s.0.63069-0.

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain DV1140^T is AJ577471.

microscopic observations and then purified. One isolate obtained at 65 °C was referenced as strain DV1140^T. Single colonies of this isolate were obtained by streaking on PEXS medium solidified with 15 g l⁻¹ Gelrite (Scott Laboratories). Plates were incubated in anaerobic jars for 3 days at 65 °C. Colonies were subsequently picked and streaked twice under the same conditions.

Microscope observations indicated that cells of isolate DV1140^T were non-motile straight rods surrounded by a sheath-like structure. Cells were approximately 1.8 ± 0.8 µm long and 0.4 ± 0.2 µm wide (mean ± 95% confidence interval) and appeared singly or in short chains. Cells were negatively stained for transmission electron microscopy (Raguénès *et al.*, 1997). No flagella were observed. The presence of a toga was observed (Fig. 1). The Ryu KOH reaction (Powers, 1995), leading to immediate cell lysis as confirmed by phase-contrast microscopy, was positive, indicating that the cells were Gram-negative.

The isolate was usually grown on glucose/yeast extract/peptone/sea salts (GYPS) medium containing (l⁻¹): 5 g (+)D-glucose (Sigma), 0.5 g yeast extract (Difco), 1 g bacto-peptone (Difco), 30 g sea salts (Sigma), 6.05 g PIPES buffer (Sigma) and 0.1% (v/v) resazurin solution. The pH was adjusted to 6.0 before autoclaving for 20 min at 121 °C. The medium was reduced by adding 0.5 g sodium sulfide before inoculation. Cultures were incubated at 65 °C under anaerobic conditions, N₂/H₂/CO₂ (90:5:5), at atmospheric pressure. Methods for the determination of growth parameters and enumeration of cells were as reported by Wery *et al.* (2001b). Growth was observed at 45–80 °C with the optimum temperature 65 °C. The strain required marine salts for growth, and grew at sea salt concentrations of 20–60 g l⁻¹ (corresponding to 15–46 g NaCl l⁻¹). No significant growth was observed at concentrations of 10 or 80 g l⁻¹. The optimum sea salt concentration was approximately 30 g l⁻¹ (corresponding to 23 g NaCl l⁻¹). Growth occurred at pH 5.0–9.0, and the optimum pH was 6.0. Growth rate decreased to 50% at pH 7.0 and to 60% at pH 8.0 in comparison with that at pH 6.0. Under optimal conditions, the maximum cell concentration obtained was 2 × 10⁸ cells ml⁻¹ and the shortest generation time observed was 72 min.

The ability to use different carbon sources was investigated

by adding one of the following compounds to a final concentration of 0.5% (w/v) instead of glucose to the GYPS medium: sucrose, cellobiose, xylose, starch, lactate, maltose, mannose, trehalose, lactose, arabinose, galactose, mannitol, peptone, Casamino acids, casein, gelatin and brain heart infusion (BHI). Weak growth was observed in the presence of yeast extract and peptone (YPS). Growth yield of strain DV1140^T was enhanced either by replacing yeast extract or peptone with 2 g BHI l⁻¹ or by the addition of gelatin, starch, galactose, arabinose, glucose, trehalose or cellobiose to YPS. Amino acids and organic acids were analysed as metabolic end products by means of HPLC as described by Wery *et al.* (2001b). Production of H₂S from elemental sulfur was investigated using lead acetate paper and 5 mM CuSO₄/50 mM HCl as indicated by Alain *et al.* (2002). H₂ and H₂S were also quantified as described by Cord-Ruwisch (1985) and Fardeau *et al.* (1993). H₂S production was observed and compared with that for controls (sterile GYPS medium with or without elemental sulfur) in the presence of 10 g l⁻¹ elemental sulfur in GYPS medium. During GYPS fermentation until stationary phase, 5.6 mM glucose was consumed, and 1.7 mM acetate, 0.14 mM isovalerate and 12.5 mM H₂ were produced. H₂S was not detected. Fermentation in the presence of 10 g elemental sulfur l⁻¹ in GYPS led to consumption of 6.0 mM glucose and production of 1.9 mM acetate, 0.15 mM isovalerate, 7.5 mM H₂ and 1.3 mM H₂S. Acetate and isovalerate were the only organic acids detected in both experiments. Amino acid analysis revealed an increase of 10 mg glycine l⁻¹, 3 mg alanine l⁻¹ and 10 mg proline l⁻¹ in the culture medium as compared with controls.

The requirement for an external electron acceptor was tested. Only a slight enhancement of growth yield (16%) was observed in the presence of 50 mM cystine. No significant differences with regard to growth kinetics and maximum cell concentrations (2 × 10⁸ cells ml⁻¹) were noticed during cultures on GYPS medium with or without elemental sulfur (10 g l⁻¹). Polysulfides (Blumentals *et al.*, 1990), sodium thiosulfate (20 mM), sodium sulfite (20 mM), sodium sulfate (20 mM), sodium nitrite (20 mM) and sodium nitrate (20 mM) did not enhance growth. No difference in growth was noticed between GYPS medium conditioned in an anaerobic chamber with or without

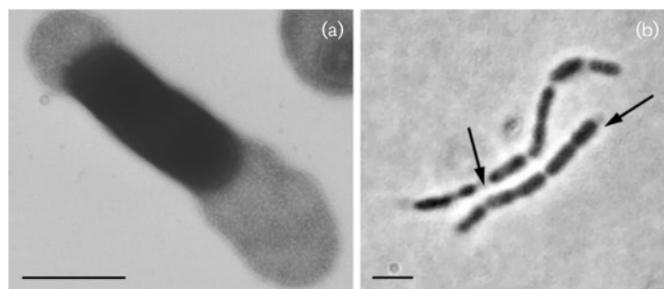


Fig. 1. (a) Electron micrograph of a negatively stained cell of strain DV1140^T showing the toga at each end. Bar, 1 µm. (b) Phase-contrast micrograph of cells in chains. The sheath-like structure surrounding the cells is indicated by arrows. Bar, 1 µm.

Na₂S. In this last case, a N₂ flow was applied for 10 min after vacuum extraction.

The effect of H₂ concentrations in the gas phase (N₂/H₂ at 100:0, 90:10, 75:25, 50:50, 25:75 and 10:90) was studied for DV1140^T and *Thermosipho geolei* SL31^T when grown in GYPS and in the medium described by L'Haridon *et al.* (2001), respectively. For both strains, the highest mean maximal concentrations from triplicate experiments at the end of the exponential phase were observed with 0% H₂ (respectively 3.6 × 10⁸ and 9.6 × 10⁷ cells ml⁻¹) and decreased linearly with an increase in H₂. We estimated from linear regressions that growth was completely inhibited with 87% H₂ for *Thermosipho geolei* SL31^T and with 29% H₂ for DV1140^T. Congruently, no significant growth was observed for *Thermosipho geolei* SL31^T with 80% H₂ (L'Haridon *et al.*, 2001).

Susceptibility to oxygen was investigated by incubating DV1140^T in GYPS medium, with or without elemental sulfur, under O₂ concentrations up to 12% of the gas phase. The initial gas phase of the culture medium (N₂/H₂/CO₂ 90:5:5) was replaced after vacuum extraction by different calibrated mixtures of N₂ and N₂/O₂ (80:20). In GYPS medium, growth was noticed up to 4% O₂. A decrease of 43% of the maximum cell concentration occurred at 2% O₂ and of 63% at 4% O₂, in comparison with a control comprising the same medium with a gas phase containing only N₂. No growth was observed for a concentration of 6%. In GYPS medium with elemental sulfur (10 g l⁻¹), significant growth was obtained up to 8% O₂. The maximum cell concentration decreased by 15% at 4% O₂, 25% at 8% O₂ and 97% at 10% O₂ in comparison with the control comprising the same medium with a gas phase containing only N₂. No significant difference appeared between controls with N₂ or N₂/H₂/CO₂ (90:5:5) gas phases. This resistance to O₂ was comparable with the results obtained for *Thermotoga* strains (Van Ooteghem *et al.*, 2001).

Genomic DNA was extracted as described by Wery *et al.* (2001a). The DNA was purified by CsCl gradient centrifugation (Wery *et al.*, 2001b) and the G+C content was determined by thermal denaturation according to the method of Marmur & Doty (1962) under the conditions reported by Raguénès *et al.* (1997). The G+C content of the genomic DNA of strain DV1140^T was 33 mol%. The 16S rRNA gene was selectively amplified as described by Wery *et al.* (2001b) and the PCR product was sequenced using the primers described by Raguénès *et al.* (1996). This almost complete sequence of 1511 bp was then compared with others available in GenBank using BLAST (Altschul *et al.*, 1997). A multiple sequence file was obtained by using the MEGALIGN program of the DNASTAR package (Promega). Alignments and similarity levels were obtained by the CLUSTAL W method with weighted residues (Thompson *et al.*, 1994). Alignments were manually corrected using the multiple sequence alignment editor SEAVIEW and the phylogenetic reconstruction was produced

using PHYLO_WIN (Galtier *et al.*, 1996) with the following algorithms: Jukes–Cantor distance matrix and successively the neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987), maximum-parsimony and maximum-likelihood methods (Felsenstein, 1981). Bootstrap values were determined according to Felsenstein (1985). Strain DV1140^T was phylogenetically affiliated to the genus *Thermosipho* (Fig. 2). The nearest recognized relatives were *Thermosipho africanus* Ob7^T (=DSM 5309^T), *Thermosipho melanesiensis* B1429^T (=DSM 12029^T), *Thermosipho japonicus* IHB1^T (=JCM 10495^T) and *Thermosipho geolei* SL31^T (=DSM 13256^T), with sequence similarity values of 91, 92, 94 and 96%, respectively. Pairwise evolutionary distances were computed by use of Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980) and a dendrogram was constructed from these distances by use of the neighbour-joining method. The positioning of strain DV1140^T was supported by the results of the three algorithms used.

A screening of eventual different enzymic activities was performed using the API ZYM system (bioMérieux) for strain DV1140^T and *Thermosipho geolei* SL31^T, its nearest relative. This system, comprising 20 reactions, has already been used to aid in identification of bacteria according to the enzymic profiles obtained (Gauthier, 1976; Hofstad, 1980; Kilian, 1978; Tharagonnet *et al.*, 1977). The test was performed at 65 °C in duplicate. Three differences were revealed between the two strains: leucine arylamidase, valine arylamidase and α-chymotrypsin reactions were only positive for strain DV1140^T.

Strain DV1140^T corresponds with the major characteristics of the *Thermotogales*. Strain DV1140^T and its nearest relative *Thermosipho geolei* SL31^T (L'Haridon *et al.*, 2001) present a similar cell morphology, but they differ with

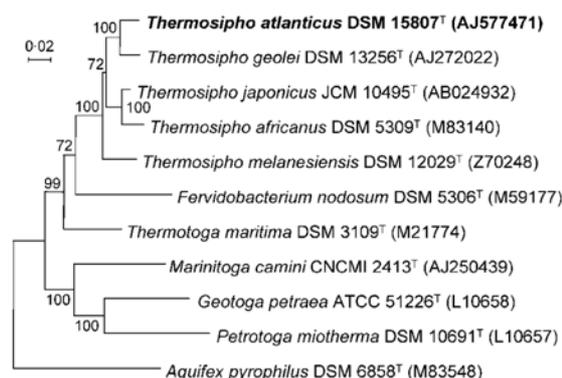


Fig. 2. Phylogenetic position of strain DV1140^T within the order *Thermotogales*. *Aquifex pyrophilus* was used as the outgroup. Accession numbers and type strains are indicated. The topology shown corresponds to an unrooted tree obtained by a neighbour-joining algorithm (Kimura corrections) established using PHYLO_WIN and manually refined using SEAVIEW. Bootstrap values are displayed on their relative branches.

L. Urios and others

Table 1. Discriminating characteristics of *Thermosipho* species

Strains: 1, *T. africanus* Ob7^T (data from Huber *et al.*, 1989); 2, *T. melanesiensis* B1429^T (Antoine *et al.*, 1997); 3, *T. geolei* SL31^T (L'Haridon *et al.*, 2001); 4, *T. japonicus* IHBI^T (Takai & Horikoshi, 2000); 5, strain DV1140^T (this work). +, Positive; –, negative; (+), weakly positive; (+Y), in the presence of yeast extract; (+C), in the presence of casein; ND, not determined. All strains produce H₂S with sulfur.

Characteristic	1	2	3	4	5
Origin:					
Place	Tadjoura gulf	Lau Basin	Western Siberia	Iheya Basin	Mid-Atlantic Ridge
Environment	Hydrothermal springs	Hydrothermal vent	Continental oil reservoir	Hydrothermal vent	Hydrothermal vent
Sample	Water and sediment	Gills of <i>Bathymodiolus</i>	Water/oil mixture	Chimney	Chimney
G + C content (mol%)	29–30	30.5	30	31.4	33
Flagella	ND	ND	1 polar	No	No
Growth conditions:					
pH range	6–8	4.5–8.5	6–9.4	5.3–9.3	5.0–9.0
pH optimum	7.2	6.5–7.5	7.5	7.2–7.6	6.0
Doubling time (min)	35	100	115	45	72
Oxygen resistance	ND	–	–	–	up to 4% (v/v)
Substrates used:					
Starch	+	(+Y) +	–	(+C) +	(+Y) +
Galactose	(+)	(+Y) +	–	(+C) +	(+Y) +
Lactose	–	(+Y) +	ND	ND	ND
Arabinose	–	ND	–	ND	(+Y) +
Maltose	+	(+Y) +	–	(+Y) +	–
Sucrose	(+)	(+Y) +	–	(+C) +	–
Stimulation of growth by:					
Elemental sulfur	+	+	+	+	–
Thiosulfate	+	–	–	+	–
H ₂ S production with thiosulfate	+	–	–	+	–
H ₂ concentration that inhibits growth (%)	≤80	≤80	87	≤80	29

regard to production of H₂S in the presence of elemental sulfur, growth on glucose, peptone and yeast extract, a (slight) stimulation of growth with cystine and 96% 16S rRNA gene sequence similarity (Table 1). Their geographical origins are very dissimilar. No flagella were found with DV1140^T cells, regardless of the growth phase. The pH optimum is clearly different (DV1140^T has the lowest pH observed for *Thermosipho* species). Under usual anaerobic culture conditions, the presence of elemental sulfur had no visible effect on growth kinetics and maximum cell concentrations, but a minor effect on glucose fermentation products. Consequently, strain DV1140^T is the only *Thermosipho* strain that remains unaffected by elemental sulfur for growth. Strain DV1140^T is able to grow at O₂ concentrations up to 8% in the presence of elemental sulfur and up to 4% O₂ without elemental sulfur, whereas growth of *Thermosipho geolei* SL31^T is inhibited at lower concentrations (0.2–1.0% O₂). Growth of DV1140^T and *Thermosipho geolei* SL31^T are inhibited with 29 and 87% H₂ in the gas phase, respectively. Strain DV1140^T was able to grow on galactose, arabinose, starch and gelatin, which are not used by *Thermosipho geolei* SL31^T. Leucine, valine arylamidase and α -chymotrypsin reactions tested with the

API ZYM system were only positive for strain DV1140^T. The G + C content of the genomic DNA of strain DV1140^T is 3 mol% higher than that of *Thermosipho geolei* SL31^T and is the highest yet found for the genus *Thermosipho* (29–31.4 mol%).

Based on phenotypic and genotypic differences between strain DV1140^T and its nearest described relative, we propose that DV1140^T should be assigned to a novel species of the *Thermosipho* genus belonging to the *Thermotogales*. Owing to its geographical origin, and in accordance with the protocol used to name previously described *Thermosipho* species, the name *Thermosipho atlanticus* sp. nov. is proposed for this novel species.

Description of *Thermosipho atlanticus* sp. nov.

Thermosipho atlanticus (at.lan'ti.cus. L. masc. adj. *atlanticus* from the Atlantic Ocean, referring to the site of isolation of the type strain).

Rod-shaped, non-motile, Gram-negative bacteria surrounded by a sheath-like structure. Growth occurs at 45–80 °C (optimum 65 °C), at pH 5.0–9.0 (optimum

pH 6.0) and at sea salt concentrations of 20–60 g l⁻¹ (optimum 30 g l⁻¹). Anaerobic, resistant to concentrations of oxygen up to 4%, heterotrophic, able to ferment BHI and also starch, galactose, arabinose, glucose, trehalose, cellobiose and gelatin in the presence of peptone and yeast extract. Elemental sulfur does not enhance growth. The G + C content of the genomic DNA is 33 mol%.

The type strain, DV1140^T (= CIP 108053^T = DSM 15807^T), was isolated from a sample collected on the Menez-Gwen hydrothermal site on the Mid-Atlantic Ridge (31° 31' W 37° 51' N; 800–1000 m water depth).

Acknowledgements

We thank C. Jeanthon (CNRS-UBO-IUEM, Plouzané, France) who kindly supplied *Thermosipho geolei* SL31^T. We thank D. Desbruyères and A.-M. Alayse (IFREMER, Brest, France), chief scientists of cruise DIVA2. We thank the captain and crew of NO *Nadir* and the DSV *Nautile* pilots and support crew. We thank M.-A. Cambon-Bonavita (IFREMER, Brest, France) for her support in phylogenetic analyses. We also thank G. Sinquin (Université de Brest, France) for his technical support with transmission electron microscopy. This work was supported by IFREMER and the French Research Ministry (Décision d'aide no. 00 G 0178).

References

- Alain, K., Pignet, P., Zbinden, M. & 8 other authors (2002). *Caminiella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1621–1628.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Antoine, E., Cilia, V., Meunier, J.-R., Guézennec, J., Lesongeur, F. & Barbier, G. (1997). *Thermosipho melanesiensis* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium belonging the *Thermotogales*, isolated from deep-sea hydrothermal vent in the southern Pacific ocean. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1118–1123.
- Blumentals, I. I., Itoh, M., Olson, G. J. & Kelly, R. M. (1990). Role of polysulfides in reduction of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1255–1262.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **4**, 33–36.
- Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Magot, M. & Ollivier, B. (1993). H₂ oxidation in the presence of thiosulfate, by a *Thermoanaerobacter* strain isolated from an oil-producing well. *FEMS Microbiol Lett* **113**, 327–332.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368–376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **30**, 783–791.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**, 543–548.
- Gauthier, M. J. (1976). *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **26**, 459–466.
- Hofstad, T. (1980). Evaluation of the API ZYM system for identification of *Bacteroides* and *Fusobacterium* species. *Med Microbiol Immunol* **168**, 173–177.
- Huber, R., Woese, C. R., Langworthy, T. A., Fricke, H. & Stetter, K. O. (1989). *Thermosipho africanus* gen. nov., represents a new genus of thermophilic eubacteria within the 'Thermotogales'. *Syst Appl Microbiol* **12**, 32–37.
- Kilian, M. (1978). Rapid identification of *Actinomycetaceae* and related bacteria. *J Clin Microbiol* **8**, 127–133.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111–120.
- L'Haridon, S., Miroshnichenko, M., Hippe, H., Fardeau, M., Bonch-Osmolovskaya, E., Stackebrandt, E. & Jeanthon, C. (2001). *Thermosipho geolei* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a continental petroleum reservoir in Western Siberia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1327–1334.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**, 109–118.
- Powers, E. M. (1995). Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3756–3758.
- Raguénès, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G. & Guézennec, J. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl Environ Microbiol* **62**, 67–73.
- Raguénès, G., Christen, R., Guézennec, J., Pignet, P. & Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 989–995.
- Saitou, M. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Takai, K. & Horikoshi, K. (2000). *Thermosipho japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* **4**, 9–17.
- Tharagonnet, D., Sisson, P. R., Roxby, C. M., Ingham, H. R. & Selkon, J. B. (1977). The API ZYM system in the identification of Gram-negative anaerobes. *J Clin Pathol* **30**, 505–509.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Urios, L., Cueff, V., Pignet, P. & Barbier, G. (2004). *Tepidibacter formicigenes* sp. nov., a novel spore-forming bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 439–443.
- Van Ooteghem, S. A., Beer, S. K. & Yue, P. C. (2001). Hydrogen production by the thermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana*. In *Proceedings of the 2001 DOE Hydrogen Program Review*, document no. NREL/CP-570-30535. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.
- Wery, N., Lesongeur, F., Pignet, P., Derennes, V., Cambon-Bonavita, M., Godfroy, A. & Barbier, G. (2001a). *Marinitoga camini* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 495–504.
- Wery, N., Moricet, J., Cueff, V., Jean, J., Pignet, P., Lesongeur, F., Cambon-Bonavita, M. & Barbier, G. (2001b). *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1789–1796.

*Impression : Service IDM/RIC
IFREMER – Centre de Brest
BP 70 – 29280 Plouzané
Tél. : 02 98 22 43 53*

Diversité de populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique profonde : cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles.

Résumé

Dans le cadre de l'exploration de la diversité microbienne des sources hydrothermales océaniques profondes, les techniques moléculaires basées sur l'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S ont permis la mise en évidence d'une grande diversité archéenne et bactérienne. Cependant, la diversité des microorganismes hydrothermaux cultivés à ce jour reste bien inférieure à celle décrite par l'approche moléculaire. Des méthodes innovantes doivent alors être mises en œuvre pour cultiver de nouveaux microorganismes, et ainsi déterminer leurs caractéristiques métaboliques et leur rôle potentiel dans l'écosystème. Tel était l'objectif de ce travail : un bioréacteur gas-lift a été utilisé pour réaliser des cultures d'enrichissement en continu, pendant 50 jours, dans des conditions de thermophilie (60°C) et d'hyperthermophilie (90°C). Un échantillon de cheminée (site Rainbow, ride medio-atlantique) a servi d'inoculum et a fait l'objet d'une analyse directe de la diversité moléculaire. La diversité des communautés microbiennes enrichies en bioréacteur a été analysée par DGGE, clonage, séquençage et hybridation. La diversité des microorganismes cultivés en continu en bioréacteur s'est avérée plus grande que celle obtenue par culture classique en flacon (batch). Au sein du bioréacteur, une dynamique de la structure de la population a pu être mise en évidence. Des microorganismes appartenant *a priori* à des espèces thermophiles modérées ont été détectés à 90°C, et des autotrophes ont été obtenus en co-culture avec des hétérotrophes à 60°C. Des échanges de métabolites peuvent expliquer ce dernier résultat. Plusieurs espèces nouvelles, détectées au préalable de façon moléculaire, ont pu être isolées à partir des cultures d'enrichissement en bioréacteur. Une nouvelle espèce de l'ordre des *Thermotogales*, *Marinitoga hydrogenitolerans*, a notamment été décrite.

Mots-clés : diversité, *Archaea*, *Bacteria*, sources hydrothermales océaniques profondes, cultures d'enrichissement, bioréacteur gas-lift, DGGE, clonage, séquençage, hybridation, isolement et caractérisation de souche.

Diversity of thermophilic microbial populations from a deep sea hydrothermal chimney: enrichment cultures in bioreactor and isolation of new species.

Abstract

To explore the microbial diversity at deep sea vents, molecular techniques based on the analysis of the gene coding the 16S ribosomal RNA permitted to highlight a large archaeal and bacterial diversity. Nevertheless, the diversity of the hydrothermal microorganisms cultivated to date remains much lower than the diversity described with molecular tools. Innovative methods should therefore be used in order to cultivate new microorganisms, and also determine their metabolic properties and their potential role in the ecosystem. That was the purpose of this study: a bioreactor gas-lift was used to perform enrichment cultures in continuous, during 50 days, in thermophilic (60°C) and hyperthermophilic (90°C) conditions. A hydrothermal chimney sample (Rainbow site, Medio-Atlantic Ridge) was used as inoculum, while its microbial diversity was also directly investigated by molecular techniques. The microbial diversity of the community enriched in bioreactor was analysed by DGGE, cloning, sequencing and hybridization. Microorganisms cultivated in continuous in bioreactor displayed a larger diversity than those cultivated in flask (batch). Moreover, a dynamics of the microbial populations was shown within the bioreactor. Microorganisms belonging *a priori* to thermophilic or moderately thermophilic species were grown at 90°C, and also autotrophic strains were obtained in co-culture with heterotrophic strains at 60°C. Metabolites exchanges could explain this last result. Several new species, detected previously only by molecular ways, could be isolated from the enrichment cultures in bioreactor. A new species belonging to the order *Thermotogales* called *Marinitoga hydrogenitolerans* was described.

Key-words: diversity, *Archaea*, *Bacteria*, deep-sea hydrothermal vents, enrichment cultures, gas-lift bioreactor, DGGE, cloning, sequencing, hybridization, strain isolation and characterization.